

原子力显微镜

在牛肉嫩度测定中的应用研究

李林强^{1,2}, 曾林森^{1,*}, 孟 嫚²

(1.西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100;

2.陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西西安 710062)

摘要:【目的】探讨原子力显微镜在牛肉嫩度测定中的应用,为肉品嫩度提供可靠、直观的测定方法。【方法】用100、150、200mmol/L不同浓度氯化钙(CaCl₂)处理牛肉,肉样真空包装后于4℃下成熟72h后测定剪切力、肌原纤维指数(MFI),并用原子力显微镜观察肌原纤维小片,比较三者结果。【结果】三种测定方法结果基本一致,但有一定差异,原子力显微镜观察肌原纤维小片直观地反映了肌原纤维小片化程度。【结论】原子力显微镜能直观地反映肉的嫩化情况,是对剪切力和MFI测定方法在形态学上的完善。

关键词:原子力显微镜,牛肉嫩度,剪切力,肌原纤维小片化指数

Study on application of atomic force microscopy in beef tenderness measurement

LI Lin-qiang^{1,2}, ZAN Lin-sen^{1,*}, MENG Man²

(1.College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 2.College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract:【Objective】Application of atomic force microscopy in beef tenderness measurement was studied to supply reliable and intuitive method for meat tenderness measurement.【Method】Beef was tenderization treated with 100, 150 and 200mmol/L calcium chloride(CaCl₂); it was vacuum-packed stored at 4℃ for three days, shear force and myofibril fragmentation index(MFI) was measured, and myofibril fragmentation was observed with atomic force microscopy (AFM) whatever results were compared with.【Result】The results of the three kinds of determination method were the same basically. But there was a little different. Myofibril fragmentation degree was intuitively reflected by AFM observation.【Conclusion】AFM can intuitively reflect the beef tenderness change in tenderization. It can perfect shear force and MFI measurement method on morphology.

Key words: atomic force microscope; beef tenderness; shear force; myofibril fragmentation index

中图分类号: TS251.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)02-0111-03

Binning等1981年利用量子力学隧道效应研制出扫描隧道显微镜(scanning tunnel microscope, STM),随后Binnig与斯坦福大学的Quate和IBM苏黎士实验室的Gerber1985年在STM基础上改进推出了原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)^[1],两者均具有纳米级超高分辨率。但相对于STM和普通电镜,AFM通过其粗细只有一个原子大小的探针在非常近的距离上探索物体表面的情况,便可以分辨出其他显微镜无法分辨的极小尺度上的表面细节

与特征^[2]。肉质嫩度是禽肉食用品质的一个重要感官特征,也是肉品质量的重要指标^[3-4]。嫩度的客观指标是剪切力值,肌原纤维小片化指数(myofibril fragmentation index, MFI)也是衡量肉嫩度的重要指标之一。由于剪切力在测定过程中很难保持肉块厚度或肉柱直径大小一致,可能导致测定误差较大。19世纪60年代研究发现肌肉的嫩度与肌原纤维的断裂有关^[5],提出了利用肌原纤维小片化指数(myofibril fragmentation index, MFI)来考察肉质的嫩度^[6],在70年代才正式建立,相比其它嫩度测定技术而言,该方法建立的时间相对较晚,在有些方面还有待进一步研究和完善^[7]。原子力显微镜是一种更为突出的显微观察技术,本文通过用不同浓度CaCl₂(100、150、200mmol/L)处理牛肉,测定剪切力和MFI,并用原子力显微镜观察肌原纤维小片,比较三者结果,拟探讨原子力显微镜在测定牛肉嫩度中的

收稿日期:2009-03-19 *通讯联系人

作者简介:李林强(1971-),男,博士研究生,研究方向:畜产品及功能食品研究。

基金项目:农业部公益性行业专项(nyhyz07-035);国家科技支撑计划-农林动物育种专项(2006BAD01A10-3);陕西省“13115”科技创新工程(2007ZDCY-01)。

应用, 以期为肉品嫩度的测定提供更为准确、可靠、直观的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

CaCl₂、KCl、K₃PO₄、EDTA、HCl、牛血清白蛋白 Roche 公司; CuSO₄ · 5H₂O, NaKC₄H₄O₆ · 4H₂O, NaOH, KI。

C-LM 型肌肉嫩度计 东北农业大学; 紫外分光光度计 UV-754, 上海; 匀浆器 德国; 冷冻离心机 SCR20BC, 日立; 原子力显微镜 Atomic Force Microscopy, WET-SPM-9500J3, 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肉样采集与处理 2 岁秦川公牛按照标准的屠宰工艺屠宰, 胴体经预冷 20h 后, 将左右两侧背最长肌取下(第 10 胸椎到第 4 腰椎), 在每条背最长肌上从前往后依次分割 10 块厚 2.5cm 肉块, 然后随机分成 4 组, 每组 5 块, 一组注射肉重 10% 的蒸馏水。另外 3 组分别注射肉重 10% 的 100、150、200mmol/L CaCl₂。将注射好的肉样真空包装后于 4℃ 下成熟 3d 后测定各项指标。

1.2.2 剪切力测定 将修整后 2.5cm 厚的分割肉块真空包装于 85℃ 水浴加热至中心温度 80℃, 取出冷却至室温并放入 4℃ 冷藏间过夜, 然后用直径 1.27cm 的中空取样器沿肌纤维方向取样。每块肉钻取 5 个肉柱, 然后用肌肉嫩度计垂直肌纤维方向测定每个肉柱的剪切力值。同一肉块所有的剪切力值的平均值即为该肉块的剪切力值。

1.2.3 肌纤维提取和 MFI 测定 去除肉样可视脂肪和结缔组织, 称取约 5g, 放入匀浆器, 加入 10mL 2℃ 分离介质(100mmol/L KCl、20mmol/L K₃PO₄、0.1mmol/L EDTA、1mmol/L CaCl₂、溶液用 HCl 调整 pH 为 7.0), 高速低温匀浆 1min。匀浆在 4℃ 低温离心机 3000 × g 下离心 15min, 然后缓慢倒出上层清液, 沉淀中又加入 10mL、2℃ 分离介质, 用搅棒制成悬液, 重复上述离心步骤, 倒出上层清液, 加入 2.5mL 分离介质于漩涡混合器上混匀, 通过 200 目筛网滤去结缔组织, 再加 2.5mL 分离介质来帮助肌原纤维通过筛孔, 混匀肌原纤维悬浮液。利用标准牛血清白蛋白配制成不同浓度的蛋白, 分别为 0、2、4、6、8、10mg/L, 利用双缩脲法其 540nm 处的吸光值, 以吸光值为纵坐标, 蛋白浓度为横坐标绘制标准曲线。用 MFI 分离介质调整悬浮液蛋白浓度为 0.5 ± 0.05mg/mL, 在 540nm 测吸光度, 将所得结果乘 200 后便得到 MFI 值。

1.2.4 原子力显微镜对肌原纤维小片的测定 按照上述方法制备混匀肌原纤维悬浮液(蛋白浓度为 0.5 ± 0.05mg/mL), 调整悬液体积为 10mL, 混匀, 吸取 1μL 肌原纤维悬液滴于云母片上, 自然风干, 直接进行原子力显微镜观察。

1.2.5 数据统计分析 运用 SPSS 软件进行数据处理, 结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Ca²⁺ 对牛肉剪切力的影响

由图 1 可知, 随着 Ca²⁺ 浓度的增加, 肉样剪切力

呈下降趋势, 表明肉的嫩度增加。不同浓度 Ca²⁺ 对牛肉处理后其剪切力均极显著下降 ($P < 0.01$), 100mmol/L 和 150mmol/L, 150mmol/L 和 200mmol/L Ca²⁺ 处理牛肉间剪切力下降差异均不显著 ($P > 0.05$)。表明 150mmol/L Ca²⁺ 对牛肉处理嫩化效果较为理想。

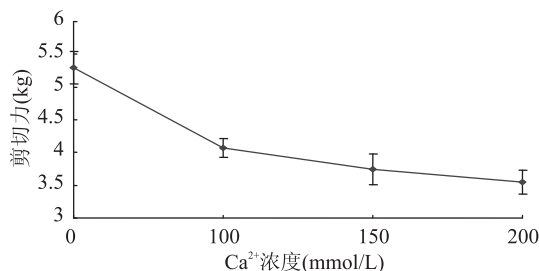


图 1 不同浓度 Ca²⁺ 对牛肉剪切力的影响

2.2 不同浓度 Ca²⁺ 对牛肉 MFI 的影响

由图 2 可知, 随着 Ca²⁺ 浓度的增加, 肉样 MFI 呈上升趋势, 但 200mmol/L Ca²⁺ 处理肉样的 MFI 下降, 与图 1 嫩化结果不同。100、150mmol/L Ca²⁺ 处理肉样的 MFI 增加显著 ($P < 0.05$), 200mmol/L Ca²⁺ 处理肉样的 MFI 相对 100、150mmol/L Ca²⁺ 处理肉样的 MFI 下降显著 ($P < 0.05$), 这与上文剪切力测定结果不同。表明 150mmol/L Ca²⁺ 对牛肉处理嫩化效果较为理想, 与上文分析结果基本一致, 但处理间结果比较的差异不同。

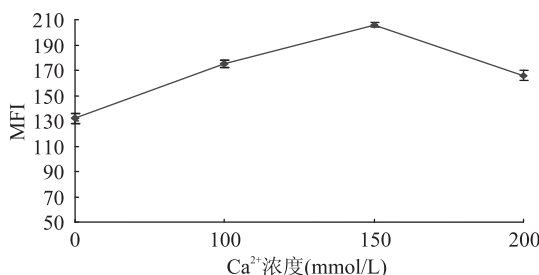


图 2 不同浓度 Ca²⁺ 对牛肉 MFI 的影响

2.3 原子力显微镜对肌原纤维小片测定

由图 3 可知, 对照肉样肌原纤维呈网状连接, 分离小片极少; 随着 Ca²⁺ 浓度的增加, 处理肉样肌原纤维小片依次显著增多。肌原纤维小片越多, 表明肌原纤维降解越多, 肉的嫩度越大, 可知, 100、150、200mmol/L Ca²⁺ 处理肉样嫩度依次增大, 这与剪切力测定结果相似, 但与以 MFI 作为嫩化指标有一定差异。又由图 3 可知, 100mmol/L Ca²⁺ 处理肉样肌原纤维直径较大约为 2.5μm, 150mmol/L Ca²⁺ 和 200mmol/L Ca²⁺ 处理肉样肌原纤维直径约为 1μm, 由于肌原纤维直径是影响肉嫩度的主要因素之一^[8-10], 因此, 150mmol/L Ca²⁺ 和 200mmol/L Ca²⁺ 处理肉样的嫩度要远远高于 100mmol/L Ca²⁺ 处理肉样和对照嫩度, 这与上文剪切力和 MFI 测定结果有一定的差异。

3 讨论

本实验所采用的 3 个浓度水平的 Ca²⁺ 处理, 以剪切力、MFI 作为嫩化指标, 结果表明, 牛肉嫩度改善显著 ($P < 0.05$), 与原子力显微镜观察测定肌原纤维小片结果基本一致。但剪切力测定结果表明, 150、

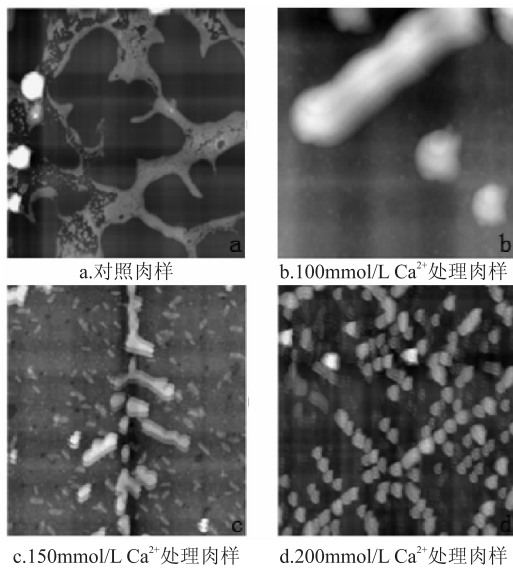


图3 不同浓度 Ca^{2+} 对肌原纤维小片化的影响

200mmol/L Ca^{2+} 对牛肉处理间结果差异不显著 ($P > 0.05$), MFI 测定结果表明, 150mmol/L Ca^{2+} 比 100mmol/L Ca^{2+} 处理牛肉嫩度显著 ($P < 0.05$), 这与原子力显微镜测定肌原纤维小片结果有所不同。原子力显微镜测定结果表明, 200、150、100mmol/L Ca^{2+} 处理肉样嫩度依次增大, 而且处理间结果差异显著。剪切力一般通过剪切力仪或质构仪剪切测定获得, 是用中空取样器沿肌纤维方向取样, 然后用剪切力仪或质构仪垂直肌纤维方向测定肉柱的剪切力值。由于肉样易变形, 即使是同一肉柱直径大小也不一, 导致测定误差较大, 影响处理间差异的比较。MFI 测定是通过制备肌原纤维悬浮液, 通过肌原纤维悬浮液的吸光值来表示嫩度, 是一种间接测定肉嫩度的方法, 由于肌原纤维小片的大小对吸光值的影响较大, 另外, 在制备肌原纤维悬浮液的过程中匀浆速度、匀浆时间均影响肌原纤维断裂指数测定^[11-12]。因此, 剪切力和 MFI 测定值并不能完全反映肉的嫩化情况。而原子力显微镜通过测定肌原纤维小片化指数及肌原纤维直径较能准确、直观地反映肉的嫩化情况, 是对 MFI 测定方法的改进和完善, 同时又克服了剪切力测定不能直接观察的缺点, 因此, 原子力显微镜是研究肉质嫩度的有力工具, 但其标准化操作还应进一步研究。

4 结论

(上接第 110 页)

- [2] Florian C, Stintzing, Reinhold Carle. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants food and in human nutrition [J]. Trends in Food Science and Technology, 2004, 23 (15): 19-38.
- [3] Mazza G. Recent development in the stabilization of anthocyanins in food products [J]. Food Chemistry, 1987, 25 (6): 207-225.
- [4] Goda Y, Shimizu T, Kato Y, et al. Two acylated anthocyanins from purple sweet potato [J]. Phytochemistry, 1997, 44 (1): 183-186.
- [5] Carlo G D. Flavonoids old and new aspects of a class of

原子力显微镜能直观地反映肉的嫩化情况, 是对剪切力和 MFI 测定方法在形态学上的完善, 是研究牛肉嫩度有力的辅助工具。

参考文献

- [1] Binning G C, F Quate, C Gerber, et al. Atomic force microscope [J]. Physics Review Letter, 1986 (4): 930-933.
- [2] 唐卓, 戴如春, 廖二元. 原子力显微镜在骨微纳观结构与功能研究中的应用 [J]. 中国医学物理学杂志, 2008, 25 (6): 911-915.
- [3] Goodson K J, Morgan W W, Reagan J O, et al. Beef customer satisfaction: Factors affecting consumer evaluations of clod steaks [J]. Animal Science, 2002, 80 (2): 401-408.
- [4] Shackelford S D, Wheeler T L, Meade M K, et al. Consumer impressions of tender select beef [J]. American Society of Animal Science, 2001, 79 (10): 2605-2614.
- [5] Takahashi K, Fukazawa T, Yasui T, et al. Formation of myofibrillar fragments and reversible contraction of sarcomeres in chicken pectoral muscle [J]. Food Science, 1967, 32 (4): 409-412.
- [6] Moller A J, Vestergaard T, Wismer - Pederson J. Myofibril fragmentation in bovine longissimus dorsi as an index of tenderness [J]. Food Science, 1973, 38 (5): 824-825.
- [7] 郑海波. 肌原纤维断裂指数及其与肉质嫩度的关系 [J]. 肉类研究, 2007, 99 (5): 13-16.
- [8] Koohmaraie M, Kent M P, Shackelford S D, et al. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? [J]. Meat Science, 2002, 62 (3): 345-352.
- [9] Ahnstrom M L, Enfalt A C, Hansson I, et al. Pelvic suspension improves quality characteristics in M. semimembranosus from Swedish dual purpose young bulls [J]. Meat Science, 2006, 72 (3): 555-559.
- [10] White A, O'Sullivan A, Troy D J, et al. Effects of electrical stimulation, chilling temperature and hot - boning on the tenderness of bovine muscles [J]. Meat Science, 2006, 73 (2): 196-203.
- [11] Hopkins D L, Martin L, Gilmour A R. The impact of homogenizer type and speed on the determination of myofibrillar fragmentation [J]. Meat Science, 2004, 67 (4): 705-710.
- [12] Olson D G, Parrish F C, Stromer M H. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscle during postmortem storage [J]. Food Science, 1976, 41 (5): 1036-1041.

natural therapeutic - drugs [J]. Life Science, 1999, 65 (4): 337-353.

- [6] 曾亚梅, 陈宏铭, 黄芯婷, 等. 大孔树脂对黄瑞木果实红色素吸附性能的研究 [J]. 福建师范大学学报, 2009, 25 (1): 91-95.
- [7] 江南生, 严曰仁, 唐本琏. 玫瑰茄红色素的鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 1990, 26 (3): 18-23.
- [8] Harborne J B. Spectral methods for characterizing anthocyanins [J]. Biochemical Journal, 1957, 70 (5): 22-28.
- [9] 马自超, 庞业珍. 天然食用色素化学及生产工艺学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1994: 64-74.