

张晨, 李红燕, 车红霞, 等. 钙离子对热加工过程中海参胶原纤维交联作用的影响 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(14): 199–205. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024080258

ZHANG Chen, LI Hongyan, CHE Hongxia, et al. Effects of Ca^{2+} on the Cross-linking of Sea Cucumber Collagen Fibers during Thermal Processing[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(14): 199–205. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024080258

· 研究与探讨 ·

钙离子对热加工过程中海参胶原纤维交联作用的影响

张 晨¹, 李红燕¹, 车红霞¹, 解万翠¹, 启 航², 孙永军³, 鞠文明³, 董秀芳^{1,4,*}

(1. 青岛科技大学生物工程学院, 山东青岛 266042;
2. 大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034;
3. 好当家集团有限公司, 山东荣成 264305;
4. 大理大学公共卫生学院, 云南大理 671000)

摘 要: 在海参的热加工过程中, 胶原纤维 (Collagen fibers, CFs) 结构发生改变影响海参质构特征, 同时可造成一定营养流失。为明确热处理条件下, 不同浓度 Ca^{2+} 对 CFs 结构的影响。本文模拟即食海参两步法热加工过程并采用两种熟化条件 (37 °C 低温嫩化 1 h, 80 °C 和 100 °C 分别热处理 1 h), 先以 Ca^{2+} 孵育的海参体壁组织为研究对象, 测定不同浓度 Ca^{2+} 作用下蛋白和多糖溶出量; 然后以提取的 CFs 为简化模型, 经相同热加工过程后, 采用 BCA 法、苯酚硫酸法、福林酚法依次测定溶出液中蛋白、多糖、TCA 可溶性寡肽的含量, 通过热重法及红外光谱法解析 CFs 结构变化。结果表明, 热加工温度越高, 蛋白、多糖的溶出量越高。当热加工温度相同时, 5 mmol/L Ca^{2+} 浓度下组织块和 CFs 溶出液各组分含量较少, 而 40 mmol/L Ca^{2+} 浓度结果则相反, 大分子蛋白逐渐降解, 产生小分子条带。不同热加工温度下, 40 mmol/L Ca^{2+} 处理的 CFs 酰胺 I 带和酰胺 A 带均出现红移现象; 5 mmol/L Ca^{2+} 100 °C 处理的 CFs 酰胺 I 带和酰胺 A 带存在蓝移。同时 Ca^{2+} 浓度越低, CFs 热分解温度越高。因此, 热加工会破坏 CFs 结构, 低浓度 Ca^{2+} 保护海参体壁和 CFs 结构, 而高浓度 Ca^{2+} 促进蛋白、多糖、TCA 溶出以及 CFs 降解。研究结果为明确 Ca^{2+} 对 CFs 结构双向作用机制, 丰富海参热处理品质控制理论奠定基础。

关键词: 钙离子, 海参体壁, 胶原纤维, 热重, 红外光谱, 交联

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)14-0199-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024080258



本文网刊:

Effects of Ca^{2+} on the Cross-linking of Sea Cucumber Collagen Fibers during Thermal Processing

ZHANG Chen¹, LI Hongyan¹, CHE Hongxia¹, XIE Wancui¹, QI Hang², SUN Yongjun³,
JU Wenming³, DONG Xiufang^{1,4,*}

(1. College of Biological Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China;
2. College of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;
3. Homey Group International Inc., Rongcheng 264305, China;
4. College of Public Health, Dali University, Dali 671000, China)

Abstract: During the thermal processing of sea cucumbers, changes in the CFs structure affect their textural characteristics and can lead to certain nutritional losses. To clarify the effect of different Ca^{2+} concentrations on the CFs structure under thermal treatment, the two-step thermal processing method for ready-to-eat sea cucumbers was simulated, using two curing

收稿日期: 2024-08-24

基金项目: 山东省自然科学基金青年科学基金项目 (ZR2021QC168); 山东省泰山产业领军人才项目“海参品质提升及绿色标准化生产关键技术创新与产业化”。

作者简介: 张晨 (2000-) (ORCID: 0009-0004-5307-1088), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海参加工品质控制机理, E-mail: ZChen20000322@163.com。

* 通信作者: 董秀芳 (1990-) (ORCID: 0000-0002-5824-1021), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 海珍品精深加工品质控制, E-mail: dxf900321@126.com。

conditions: low-temperature tenderization (37 °C, 1 h) followed by heat treatment (80 °C and 100 °C, 1 h each). Initially, the study focused on the body wall tissue of sea cucumbers incubated with Ca^{2+} , measuring the amount of protein and polysaccharides leached out under different concentrations of Ca^{2+} . Subsequently, the extracted CFs were served as a simplified model, and after undergoing the same thermal processing, the contents of protein, polysaccharides and TCA soluble oligopeptides in the dissolution were determined by BCA, phenol sulfuric acid and Folin-method, respectively. The structural changes of CFs were analyzed by DTG and FTIR. The results showed that the higher the thermal processing temperature, the higher the dissolution amount of protein and polysaccharide. When the thermal processing temperature was the same, the contents of tissue blocks and CFs dissolved solution were less at 5 mmol/L Ca^{2+} concentration, the results at 40 mmol/L Ca^{2+} were the opposite, with macromolecular proteins gradually degrading into smaller molecular bands. Under different thermal processing temperatures, the amide I band and amide A band of CFs treated with 40 mmol/L Ca^{2+} showed red shift. Conversely, the amide I and amide A bands of CFs treated with 5 mmol/L Ca^{2+} at 100 °C showed blue shifts. Furthermore, lower concentrations of Ca^{2+} correlated with higher thermal decomposition temperatures of CFs. Therefore, thermal processing disrupted the structure of CFs, with low concentrations of Ca^{2+} protecting the body wall and CFs structure, while high concentrations of Ca^{2+} promoted the leaching of protein, polysaccharides, TCA-soluble oligopeptides, and CFs degradation. The findings established a foundation for elucidating the bidirectional mechanism of Ca^{2+} on CFs structure and enriching the theoretical framework for quality control in the thermal processing of sea cucumbers.

Key words: Ca^{2+} ; sea cucumber body wall; collagen fiber; thermogravimetry; infrared spectrum; cross-linking

海参的主要可食用部分是体壁,在受到外界的物理刺激后,体壁会发生自降解,破坏海参品质,造成了很大的经济损失^[1-2]。而内源性蛋白酶(如半胱氨酸蛋白酶^[3]、组织蛋白酶^[4]、caspase 蛋白酶^[5]以及基质金属蛋白酶^[6]等)是引起海参体壁自降解的主要原因。因此,新鲜海参捕获后,需要尽快进行热处理,以钝化内源性蛋白酶。不同的热加工温度和时间均会对海参的营养品质产生影响。海参在 80 °C 下加热时间越长,其体壁胶原纤维(Collagen fibers, CFs)降解程度越严重^[7]。同时,随着热加工温度的升高(60~120 °C),蛋白和多糖分子量显著降低,CFs 和胶原蛋白的 D 周期带被破坏^[8]。新鲜的海参体壁是一种非弹性结构。在热处理过程中,非弹性结构会逐渐转变为不稳定的弹性凝胶结构。适度的热处理(低于 100 °C)会使海参凝胶化,剧烈热处理(高于 100 °C)会破坏体壁的弹性凝胶结构,导致 CFs 和凝胶网状结构解体,最终完全失去弹性^[9]。为了减缓热加工对海参品质的负面影响,常在热处理前进行低温预处理。低温嫩化技术可以适度降解组织中维持肌原纤维完整性的结构蛋白和其他相关蛋白而达到嫩化效果。Dong 等^[10]和 Bi 等^[11]分别采用 37 °C 低温处理和两步法(40 °C 预处理 90 min, 80 °C 处理 120 min)处理海参。海参自溶过程中,外观以及力学性能的变化是由于 CFs 以及微纤维等大分子降解所致。而 CFs 是由胶原、蛋白聚糖、糖蛋白等基本结构组成的大分子,对海参体壁起到支撑作用^[12]。因此,研究热处理对 CFs 的影响具有重要意义。热处理会导致海参 CFs 变粗变短,聚集交联形成多孔网状结构。在一定程度上揭示了热处理对海参质地和微观结构的重要影响^[13-14]。

嫩度是一种重要的感官属性,是评价海参质量的重要指标。而大量研究发现, Ca^{2+} 对肉类的嫩化有着积极的作用,即适当活化内源性蛋白酶,降解细胞

骨架蛋白;与 CFs 上的羧基形成静电作用,影响其电荷分布,导致结构蛋白的降解^[15-16]。如 Ca^{2+} 可以激活钙蛋白酶的活性,改变肌原纤维的结构并缩短分子间隙^[17]; Ca^{2+} 通过与胶原分子间的螯合作用调节 II 型 CFs 的结构和力学特性^[15]。此外研究发现,在磷酸化基础上进行 1% CaCl_2 交联会对刺参胶原聚集凝胶特性产生明显影响,其硬度及粘性比磷酸化刺参高,水分活度降低,提高了胶原聚集体与水分的结合程度,增强了凝胶性,使得 CFs 结构更加稳定^[18]。

海参体壁是以胶原蛋白交联形成的 CFs 为主体,而热处理可导致胶原蛋白的构象趋向不稳定。从海参体壁中提取 CFs,去除了内源酶,以及水溶性、酸溶性成分,保持了完整 CFs 结构。本文采用两步法(37 °C 低温嫩化 1 h, 80 °C 和 100 °C 分别热处理 1 h),探究 Ca^{2+} 对海参体壁组织的影响;采用相同的热加工方式,探究不同 Ca^{2+} 浓度对 CFs 模型的影响作用,测定溶出液中蛋白、多糖以及 TCA 可溶性寡肽含量;通过红外光谱法及热重法评价 CFs 的结构变化。旨在探究 Ca^{2+} 对热加工中 CFs 结构作用机制,为后续海参加工提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜海参(重 150~200 g/只) 山东省青岛市市北区开平路市场;无水氯化钙(纯度: $\geq 99.9\%$)、考马斯亮蓝 R-250、三氯乙酸、无水碳酸钠、酒石酸钾钠、五水合硫酸铜、福林酚乙液、冰乙酸 均为分析纯,上海麦克林生物化学有限公司;苯酚 分析纯,天津市大茂化学试剂厂;PAGE 凝胶快速制备试剂盒、Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液(10 $\times$)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、BSA 牛血清蛋白 上海雅酶生物科技有限公司;浓硫酸 分析纯,青岛莱博赛斯科技有限公司。

Multiskan FC 酶标仪、IS50 红外光谱仪 赛默

飞世尔仪器有限公司; 303-00AB 电热恒温培养箱
上海一恒科学仪器有限公司; Happy-TL20 离心机
济南福的机械有限公司; UV-1800PC 紫外可见分光
光度计 上海翱艺仪器有限公司; DYCZ-24DN
电泳仪 北京六一仪器有限公司; STA449F5 热重分
析仪 耐驰上海机械仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 海参预处理 新鲜的海参宰杀从肛门处纵向
切开, 去肠去筋, 剪去头和肛门, 每只海参体壁平均分
成六段, 重复上述步骤, 共六只海参每组六段。

1.2.2 不同热加工方式处理海参体壁组织 每组分
别加入 0、2.5、5、10、20、40 mmol/L 的 CaCl_2 溶液
(w:v=1:2), 置于 37 °C 水浴锅中嫩化 1 h, 随后分为
两组, 每组三个平行, 分别于 80、100 °C 热加工
1 h。煮沸溶出液至 -20 °C 冰箱中储存, 用于后续蛋
白、多糖的测定。

1.2.3 CFs 提取 新鲜海参预处理, 称重后切成小块
匀浆; 加入五倍体积的去离子水, 在 4 °C 磁力搅拌
1.5 h; 过滤取沉淀, 加入 0.5 mol/L 冰醋酸 (w:v=
1:5), 在 4 °C 条件下磁力搅拌 72 h; 过滤取沉淀, 加
入去离子水 (w:v=1:5), 在 4 °C 条件下磁力搅拌
1.5 h, 该步骤重复两次, 过滤得到的沉淀即为 CFs
模型。

1.2.4 不同热加工方式处理 CFs 称取等质量的
CFs (共两组每组 3 份), 分别加入去离子水、5 mmol/
L、40 mmol/L CaCl_2 溶液 37 °C 下嫩化 1 h, 其中一
组于 100 °C 热加工 1 h, 另一组 80 °C 热加工 1 h。
随后冰水降温, 上清液透析脱盐后冻干。冻干粉末
加 4 mL 去离子水复溶后用于蛋白、多糖、可溶性寡
肽溶出量测定, 沉淀冻干样品用于后续红外光谱与
热重分析。

1.2.5 海参体壁组织和 CFs 溶出液中蛋白、多糖、可
溶性寡肽含量的测定

1.2.5.1 蛋白含量的测定 将热加工后海参组织溶
出液与考马斯亮蓝溶液 1:50 混合, 充分振荡静置
15 min, 于 595 nm 处采用紫外分光光度计测定吸光
值, 每组三次平行; 采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒,
测定 CFs 溶出液中蛋白浓度。蛋白标准曲线方程
为: $y=0.4853x$, $R^2=0.9969$ 。其中, y 代表牛血清白蛋
白在 595nm 处吸光度; x 代表牛血清白蛋白浓度
(mg/mL)。

1.2.5.2 多糖含量的测定 将热加工后海参组织和
CFs 溶出液与苯酚、浓硫酸以 1:1:5 比例混合。充
分振荡后静置 30 min, 采用紫外分光光度计在波长
490 nm 处测定吸光度, 每组三次平行, 标准曲线为:
 $y=0.0123x$, ($R^2=0.9995$)。其中, y 代表葡萄糖在
490 nm 处吸光度; x 代表葡萄糖浓度($\mu\text{g/mL}$)。

1.2.5.3 可溶性寡肽含量(TCA)的分析 将热加工
后 CFs 溶出液与 TCA 溶液以 1:1 比例混合, 充分振

荡后冰水浴 20 min, 13500×g 条件下离心 20 min。
上清液采用福林酚法测定可溶性寡肽含量, 每组三
次平行, 标准曲线方程为: $y=0.2819x+0.002$, ($R^2=$
0.9957)。其中, y 代表牛血清白蛋白在 500 nm 处吸
光度; x 代表牛血清白蛋白浓度(mg/mL)。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳 采用 Laemmli^[19] 方法, 使
用 10% 分离凝胶和 5% 浓缩凝胶进行 SDS-PAGE
分析。热加工 CFs 溶出液与 5% β -巯基乙醇上样缓
冲液按 4:1 的比例进行混合, 于沸水浴中煮 5 min。
将样品(10 μL)加入孔中, 以 15 mA 的恒定电流进行
浓缩胶电泳, 以 30 mA 的恒定电流进行分离凝胶电
泳。电泳结束后, 考马斯亮蓝 R-250 对凝胶进行
染色。

1.2.7 CFs 结构变化分析

1.2.7.1 FTIR 测定 取 1.2.4 沉淀冻干样品, 与干燥
的溴化钾按照 100:1(w/w)混合研磨, 采用红外光谱
仪分析。测试参数的显微镜是晶体锗, 显微镜折射系
数 $n=4.0$, 光线入射角为 45 °, 光圈尺寸为 100 μm ×
100 μm , 累积的次数为 6, 分辨率为 2 cm^{-1} , 测定的范
围为 4000~1000 cm^{-1} 。

1.2.7.2 DTG 测定 取 1.2.4 沉淀冻干样品, 利用热
重分析仪分析。升温速率为 10 K/min, 升温温度范
围为 20~700 °C。通过检测样品温度和质量的变
化, 先得到失重率与温度变化的热重曲线, 再将热重曲
线对温度进行一次求导得到微商热重曲线, 进而更直
接地反映失重率与温度的关系。

1.3 数据处理

实验重复测定 3 次, 结果以平均值±标准差表
示。采用 Origin 2021(OriginLab 软件公司, Hamp-
ton, MA, USA)软件作图。数据统计分析采用 IBM
SPSS 23(IBM SPSS 软件公司, Chicago, IL, USA)软
件, 单因素方差分析时选用 Duncan 法进行显著水平
分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 海参体壁组织溶出物组分分析

海参组织块的蛋白、多糖、TCA 溶出量如图 1
所示。在相同的 Ca^{2+} 浓度下, 100 °C 热加工的海参
组织块溶出物含量高于 80 °C。即温度越高, 海参体
壁组织被破坏的程度越大。胶原纤维蛋白与多糖溶
出量越多。说明高温在一定程度上破坏了 CFs 内部
结构, 导致 CFs 孔隙变大, 蛋白与多糖溶出量增加。
研究发现 80 °C 热加工海参体壁, CFs 组织保持原有
的交联结构; 当温度升高时, CFs 变短、疏松、无序,
出现分解现象^[9]。与添加 Ca^{2+} 组相比, 空白组的蛋
白、多糖溶出量最高。随着 Ca^{2+} 浓度的增加, 海参组
织块蛋白、多糖溶出量呈现先降低后升高的趋势
($P<0.05$)。推断 Ca^{2+} 一定程度上可以抑制海参组织
块的水解, 减少蛋白、多糖的溶出。 Ca^{2+} 通过增加蛋
白质内部的分子间相互作用, 如氢键和疏水作用, 诱

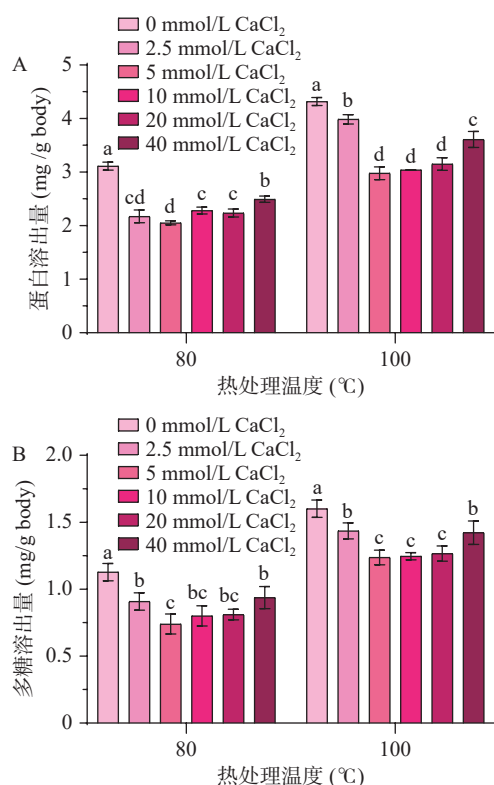


图1 不同热加工方式和不同 Ca^{2+} 浓度下海参组织块溶出量

Fig.1 Dissolution of sea cucumber tissue mass under different thermal processing methods and different Ca^{2+} concentrations

注: A. 蛋白溶出量; B. 多糖溶出量; 小写字母不同表示同一处理温度, 不同 Ca^{2+} 浓度之间差异显著 ($P < 0.05$); 图2同。

导蛋白质的折叠与聚集, 这种稳定的结构使得蛋白质难以被水分子破坏, 从而降低了其在水中的溶出^[20]。低浓度 Ca^{2+} (2.5、5 mmol/L) 具有更好的保护作用, 高浓度 Ca^{2+} (10、20、40 mmol/L) 会破坏 CFs 的结构, 导致溶出量增多。

2.2 CFs 溶出物组分分析

CFs 溶出物组分变化如图2所示。 Ca^{2+} 浓度相同时, 相比于 80 °C, 在 100 °C 的热加工方式下, CFs 蛋白、多糖和 TCA 的溶出量显著高于 80 °C。说明高温条件下海参 CFs 交联结构被破坏, 蛋白聚糖桥断开, 胶原纤维结构解体为胶原蛋白, 随后进一步凝集变性为明胶, 同时凝胶化形成网络状结构^[13]。温度越高, 结构破坏程度越显著, 胶原蛋白发生凝聚, 网络结构遭到破坏, 变性的胶原充盈在网络之间。与对照组相比, 5 mmol/L Ca^{2+} 的 CFs 溶出物含量较少, 40 mmol/L Ca^{2+} 溶出液含量更多。胶原的自组装过程是胶原分子通过分子间氢键、疏水键等作用相互结合, 形成纤维的过程^[21]。推测由于低浓度 Ca^{2+} 促进胶原的自组装过程, 且速率超过了热处理下蛋白、多糖、TCA 的溶出速率, 在一定程度上减少了溶出量。而随着 Ca^{2+} 浓度增加, CFs 的交联结构被破坏, CFs 之间的蛋白聚糖桥断裂, 溶出量增加。同时 Ca^{2+} 浓度越大, 占据胶原分子中形成氢键的位点, 水分子进入胶原二级结构中致使胶原变粗, 分子间自组装程度减少^[18,21-22]。与 Niu 等^[23] 研究结果一致, 该

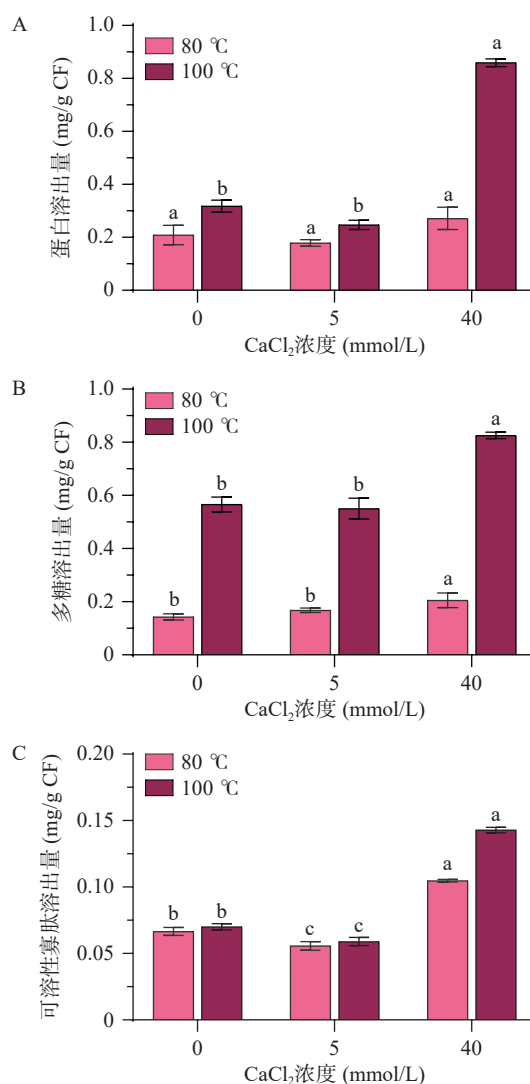


图2 不同热加工方式和不同 Ca^{2+} 浓度下 CFs 溶出量

Fig.2 Dissolution of CFs under different thermal processing methods and different Ca^{2+} concentrations

注: A. 蛋白溶出量; B. 多糖溶出量; C. 可溶性寡肽溶出量。

研究发现 Ca^{2+} 对胶原蛋白存在双向作用, 即低浓度 (1 mmol/L) Ca^{2+} 可促进胶原蛋白自组装, 稳定胶原蛋白结构。相反, 在 Ca^{2+} 浓度较高时 (14 mmol/L), 胶原蛋白的自组装程度降低。

2.3 CFs 溶出蛋白的分布模型

SDS-PAGE 凝胶电泳可以反映蛋白质样品在电场作用下根据其分子大小的迁移速度, 从而帮助分析其分子量和可能的组成结构^[24-25]。CFs 经过热加工后的蛋白分子量分布如图3所示。80 °C 热处理条件下主要以 235 kDa (卵黄蛋白)、100 kDa (α-肌动蛋白) 以及 44.3 kDa (肌动蛋白) 组分存在。而 100 °C 热加工条件下更多的是低于 100 kDa 的组分, 66.7 kDa, 50 kDa (肌钙蛋白), 35 kDa (原肌球蛋白), 235 kDa 条带未观察到, 与张倩^[26] 的实验结果相近。说明随着加热温度的升高, 卵黄蛋白逐渐被降解。主要是由于在加热过程中氢键及肽键受热断裂, 导致卵黄蛋白发生降解, 肌钙蛋白与肌球蛋白明显增加。热加工温度越高, 蛋白质容易在短时间完全变

性, 带有疏水基团的蛋白质相互作用发生聚集, CFs 内部重新排列导致凝胶化, 形成可溶性的明胶, 使得原本有序的结构变得松散, 破坏了蛋白聚糖与 CFs 的共价结合, 造成蛋白和多糖的损失^[27-29]。这与姜晓明^[30]的结果一致。热加工条件相同时, 随着 Ca^{2+} 浓度的增加, 大分子量条带变浅, 部分卵黄蛋白降解为小分子。 Ca^{2+} 浓度越高, 小分子条带越明显。与上述 TCA 溶出含量相对应。

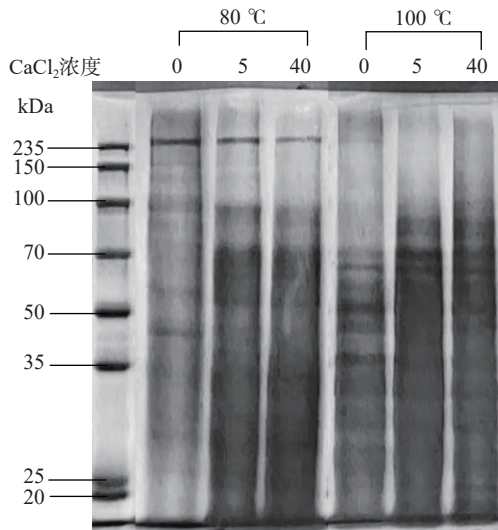


图 3 不同热加工方式和不同 Ca^{2+} 浓度下的 CFs 蛋白电泳图
Fig.3 Electrophoresis of CFs proteins under different thermal processing methods and different Ca^{2+} concentrations

2.4 CFs 结构变化分析

2.4.1 FTIR 分析 由图 4 和表 1 可知, 不同热加工方式和 Ca^{2+} 浓度处理下, CFs 表现出不同的特征吸收峰位置。CFs 的酰胺 A 带在 $3300\sim3400\text{ cm}^{-1}$ 左右, 表明分子中存在氢键, 胶原蛋白在 3400 cm^{-1} 左右的吸收峰是酰胺 A 带的 N-H 伸缩(氢键)振动产生。波数在 1650 cm^{-1} 左右的酰胺 I 带的吸收峰是由蛋白多肽骨架中 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动产生, 酰胺 I 带通常不受肽链侧基影响, 振动频率取决于肽链构型, 因此其对胶原蛋白三螺旋结构的变化十分敏感, 可用于表征胶原蛋白三螺旋结构的稳定性。波数在 1530 cm^{-1} 左右的吸收峰, 是由 C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动产生的酰胺 II 带的特征吸收波数。波数在 1240 cm^{-1} 左右的酰胺 III 带的吸收峰, 是由 C-N 伸缩振动和同

相 N-H 弯曲振动共同引起的^[31-33]。

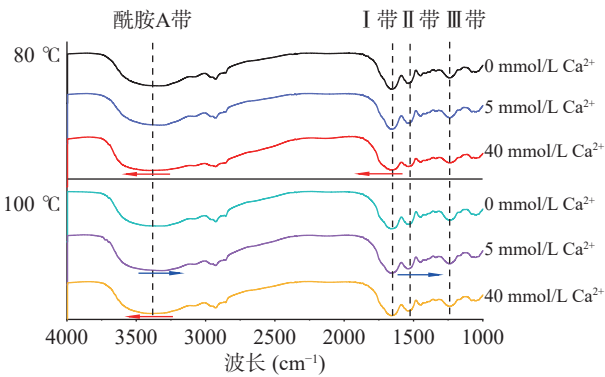


图 4 不同热加工方式和不同 Ca^{2+} 浓度下 CFs 的 FTIR 光谱图
Fig.4 FTIR spectra of CFs under different thermal processing methods and different Ca^{2+} concentration

蛋白构象决定了酰胺各带的特征吸收波数, 通常酰胺 I 带波数越高的胶原蛋白结构稳定性较低^[34]。 Ca^{2+} 浓度为 40 mmol/L 时, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热处理酰胺 I 带存在红移, 表明热处理致使部分 CFs 断裂, 胶原纤维出现成束聚集, 逐渐收缩, 降低其稳定性。 Ca^{2+} 浓度为 5 mmol/L 时, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热处理的 CFs 酰胺 A 带和酰胺 II 带发生蓝移, 表明低浓度 Ca^{2+} 在一定程度上可以保护 CFs。故不同浓度 Ca^{2+} 均可影响 CFs 之间氢键以及非共价键而导致 CFs 结构稳定性的改变。

2.4.2 热重分析 DTG 图是通过热重分析仪在特定温度变化过程中, 测量样品重量变化率随温度变化的曲线。其峰值表示样品在该温度下质量变化最快, 为 CFs 最大失重速率对应的温度, 可表示胶原蛋白肽键的热稳定性^[35-36]。DTG 曲线总体可分为两个主要阶段: 第一个阶段是从室温到 $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右, 质量的损失主要是吸附水及小分子的蒸发导致, 也就是胶原蛋白热变性的过程。第二个阶段是从 $170\sim500\text{ }^{\circ}\text{C}$, 其间胶原中的肽键在热的作用下发生断裂, 胶原逐渐被降解为多肽以及氨基酸, 最终被破坏, 脱氨、脱水。大部分的质量损失发生在第二阶段。第二阶段的反映了肽键的稳定性。

由图 5 和表 2 可知, 不同热加工条件下, 对应的特征分解温度变化较小。 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热加工特征分解温度略低于 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。同一热加工条件下, 随着 Ca^{2+} 浓度

表 1 不同热加工方式和不同 Ca^{2+} 浓度下 CFs 的酰胺各带位置

Table 1 Location of amide bands of CFs under different thermal processing methods and different Ca^{2+} concentrations					
热处理	CaCl_2 浓度 (mmol/L)	酰胺 A 带 (cm^{-1})	酰胺 I 带 (cm^{-1})	酰胺 II 带 (cm^{-1})	酰胺 III 带 (cm^{-1})
80 °C	0	3343.31±11.31 ^b	1658.50±0.02 ^b	1535.47±0.01 ^a	1238.76±0.19 ^a
	5	3342.79±10.78 ^b	1658.53±0.03 ^b	1534.67±1.17 ^a	1238.89±0.20 ^a
	40	3406.30±2.54 ^a	1659.04±0.47 ^a	1535.08±0.03 ^a	1238.34±0.49 ^a
100 °C	0	3351.62±20.04 ^b	1658.64±0.08 ^a	1535.19±0.04 ^b	1238.57±0.37 ^a
	5	3314.58±2.84 ^c	1658.56±0.02 ^a	1535.57±0.07 ^a	1238.43±0.31 ^a
	40	3396.03±2.21 ^a	1658.62±0.05 ^a	1535.22±0.02 ^b	1239.01±0.18 ^a

注: 小写字母不同表示同列下同一处理温度、不同 Ca^{2+} 浓度之间差异显著 ($P<0.05$)。

的增加,CFs 特征分解温度呈现先升高再降低的趋势。说明低浓度 Ca^{2+} 保护 CFs 的结构,高浓度的 Ca^{2+} 降低肽键的稳定性,促进 CFs 降解。与前面实验结果一致。

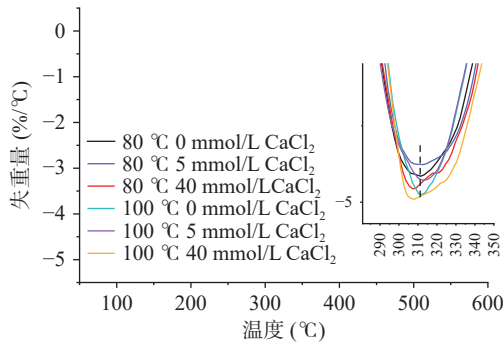


图 5 不同热加工方式和不同 Ca^{2+} 浓度下 CFs 的 DTG 图
Fig.5 DTG plots of CFs under different thermal processing methods and different Ca^{2+} concentrations

表 2 不同热加工方式和不同 Ca^{2+} 浓度下 CFs 的特征分解温度
Table 2 Characteristic decomposition temperatures of CFs under different thermal processing methods and different Ca^{2+} concentrations

热处理温度(°C)	80			100		
CaCl_2 浓度(mmol/L)	0	5	40	0	5	40
特征分解温度(°C)	310.8	312.3	308.5	310.2	314	307.2
最大失重率(%/°C)	-0.66	-0.67	-0.67	-0.62	-0.66	-0.68

3 结论

热加工温度越高,对应溶出液中蛋白、多糖以及 TCA 可溶性寡肽含量越多。高温条件导致 CFs 解聚、断裂,逐渐解体为胶原蛋白,随后热变性为明胶,形成网络结构。热处理条件相同时,低浓度 Ca^{2+} 在一定程度上抑制组织块和 CFs 溶出液中蛋白、多糖以及 TCA 可溶性寡肽的溶出,而当 Ca^{2+} 浓度较高时,会破坏 CFs 内部交联作用,导致蛋白聚糖桥断裂,促进胶原分解。综上所述, Ca^{2+} 对 CFs 的结构变化存在双向作用。即低浓度 Ca^{2+} (5 mmol/L) 保护 CFs 结构, Ca^{2+} 通过与 CFs 中的羧基等基团形成钙盐桥,形成交叉的网络结构,增强 CFs 稳定性,促进其自组装;当两种键合达到饱和时,过量的 Ca^{2+} 会增加 CFs 间的空隙。高浓度 Ca^{2+} (40 mmol/L) 破坏 CFs 内部结构,促进 CFs 降解。本研究模拟海参产品加工的步骤,以 CFs 为模型,探究了 Ca^{2+} 对其结构以及交联程度可能存在的影响。为明确 Ca^{2+} 对 CFs 结构作用机制,丰富低温嫩化海参品质控制奠定理论基础。后续探究热处理温度与 Ca^{2+} 浓度之间协同作用的最优组合,并与实际工业生产相结合,优化海参加工工艺。

参考文献

[1] DONG X F, YANG X H, LI H Y, et al. Effects of oxidation on the structure of collagen fibers of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) body wall during thermal processing[J]. *LWT*, 2021, 138: 110528.

[2] 王长伟, 冯晓梅, 刘楚怡, 等. 不同海域野生海参体壁营养成分的比较分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 341-348.

[3] WANG C W, FENG X M, LIU C Y, et al. Comparative analysis of nutritional components of wild sea cucumbers in different sea areas[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(5): 341-348.

[4] WU H T, LI D M, ZHU B W, et al. Proteolysis of noncollagenous proteins in sea cucumber, *Stichopus japonicus*, body wall: Characterisation and the effects of cysteine protease inhibitors[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2): 1287-1294.

[5] LIU Y X, ZHOU D Y, MA D D, et al. Changes in collagenous tissue microstructures and distributions of cathepsin L in body wall of autolytic sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. *Food Chemistry*, 2016, 212: 341-348.

[6] SU L, YANG J F, FU X, et al. Ultraviolet-ray-induced sea cucumber (*Stichopus japonicus*) melting is mediated by the caspase-dependent mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(1): 45-52.

[7] LIU Z Q, LIU Y X, ZHOU D Y, et al. The role of matrix metalloprotease (MMP) to the autolysis of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(13): 5752-5759.

[8] DONG X P, LIU W T, SONG X, et al. Characterization of heat-induced water adsorption of sea cucumber body wall[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(1): 92-100.

[9] WANG J, LIN L, SUN X, et al. Mechanism of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) body wall changes under different thermal treatment at micro-scale[J]. *LWT*, 2020, 130: 109461.

[10] ZHANG K, HOU H, BU L, et al. Effects of heat treatment on the gel properties of the body wall of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 54(3): 707-717.

[11] DONG X F, QI H, FENG D D, et al. Oxidative stress involved in textural changes of sea cucumber *Stichopus japonicus* body wall during low-temperature treatment[J]. *International Journal of Food Properties*, 2018, 21(1): 2646-2659.

[12] BI J R, LI Y, CHENG S S, et al. Changes in body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) during a two-step heating process assessed by rheology, LF-NMR, and texture profile analysis[J]. *Food Biophysics*, 2016, 11(3): 257-265.

[13] LIU Y X, ZHOU D Y, MA D D, et al. Effects of endogenous cysteine proteinases on structures of collagen fibres from dermis of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. *Food Chemistry*, 2017, 232: 10-18.

[14] 姜丹. 海参体壁胶原的物性学及组织形态学研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2015.

[15] JIANG D. Study on physical properties and histomorphology of collagen from sea cucumber body wall *Stichopus japonicus* [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2015.

[16] 高昕, 刘莲凤, 刘倩, 等. 不同加热温度下刺参肌肉组织与胶原纤维结构的变化[J]. 水产学报, 2012, 36(9): 1465-1472.

[17] GAO X, LIU L F, LIU Q, et al. Changes of muscle tissue and collagen fibers structure of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) during

- heated treatment[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(9): 1465–1472.]
- [15] PANG X C, LIN L J, TANG B. Unraveling the role of Calcium ions in the mechanical properties of individual collagen fibrils[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 46042.
- [16] LI X, SUN Y Y, PAN D D, et al. The effect of CaCl_2 marination on the tenderizing pathway of goose meat during conditioning [J]. *Food Research International*, 2017, 102: 487–492.
- [17] 陈雪妍, 罗瑞明, 张倩, 等. 氯化钙对宰后成熟期间滩羊肉能量水平及品质的影响[J]. *食品科学*, 2023, 44(24): 9–15. [CHEN X Y, LUO R M, ZHANG Q, et al. Effects of calcium chloride on energy level and quality of tan sheep during post-slaughter aging[J]. *Food Science*, 2023, 44(24): 9–15.]
- [18] 彭喆, 侯虎, 冯雁临, 等. 磷酸化与钙交联处理对刺参胶原聚集凝胶特性的影响[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(10): 190–195. [PENG Z, HOU H, FENG Y L, et al. Effects of phosphorylation and calcium cross-linking on the gel properties of sea cucumber collagen aggregates[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(10): 190–195.]
- [19] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227 (5259): 680–685.
- [20] JIA D, You J, Hu Y, et al. Effect of CaCl_2 on denaturation and aggregation of silver carp myosin during setting[J]. *Food Chemistry*, 2015, 185: 212–218.
- [21] 黄兆龙, 何英, 蔡群, 等. 钙镁离子对胶原自组装的影响[J]. *红河学院学报*, 2005(3): 1–4. [HUANG Z L, HE Y, CAI Q, et al. Effect of calcium and magnesium ions on collagen self-assembly[J]. *Journal of Honghe University*, 2005(3): 1–4.]
- [22] BU H, LI G. Comparative investigation of hydroxyapatite/collagen composites prepared by CaCl_2 addition at different time points in collagen self-assembly process[J]. *Journal of Materials Science*, 2018, 53(9): 6313–6324.
- [23] NIU X F, FAN R, TIAN F, et al. Calcium concentration dependent collagen mineralization[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 73: 137–143.
- [24] 徐静, 丁珊珊, 陶宇婷, 等. 天然保鲜剂对牛肉贮藏期间水分和蛋白质结构变化的影响[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(17): 380–387. [XU J, DING S S, TAO Y T, et al. Effects of natural preservatives on the moisture and protein structure changes of beef during storage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(17): 380–387.]
- [25] ZHANG M, LIU Y X, WU Z X, et al. Analysis of texture properties and water-soluble fraction proteome of sea cucumber body wall with different boiling heating treatment[J]. *Food Chemistry*, 2023, 409: 135333.
- [26] 张倩. 海参微波真空干燥及对品质的影响机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023. [ZHANG Q. Study on sea cucumber microwave vacuum drying and influence mechanism on its quality[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.]
- [27] 姜昕. 马铃薯和木薯淀粉添加对不同加热温度诱导的鲢鱼糜凝胶特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023. [JIANG X. Effects of potato and tapioca starch addition on the gelling properties in *Hypophthalmichthys molitrix* surimi induced by different heating temperatures [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.]
- [28] LI X X, FAN M C, HUANG Q L, et al. Effect of micro-and nano-starch on the gel properties, microstructure and water mobility of myofibrillar protein from grass carp[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130579.
- [29] MATSUOKA Y, WAN J R, USHIO H, et al. Thermal gelation properties of white croaker, walleye pollack and deepsea bonefish surimi after suwari treatment at various temperatures[J]. *Fisheries Science*, 2013, 79(4): 715–724.
- [30] 姜晓明. 海参真空蒸煮技术及产品的开发[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014. [JIAN X M. The sea cucumber vacuum cooking technology and product development [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.]
- [31] LI Y Y, QI X, FAN C Z, et al. Novel synergistic cross-linking ameliorate ready-to-eat sea cucumber deterioration and its quantum chemical analysis[J]. *Food Chemistry*, 2024, 439: 138097.
- [32] EL MOUJAHED S, ERRACHIDI F, ABOU OUALID H, et al. Extraction of insoluble fibrous collagen for characterization and crosslinking with phenolic compounds from pomegranate byproducts for leather tanning applications[J]. *RSC Advances*, 2022, 12(7): 4175–4186.
- [33] KISHEN A, SHRESTHA S, SHRESTHA A, et al. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation[J]. *Dental Materials*, 2016, 32(8): 968–977.
- [34] GE X T, WANG H L, YIN M Y, et al. Effect of different thawing methods on the physicochemical properties and microstructure of frozen instant sea cucumber[J]. *Foods*, 2022, 11(17): 2616.
- [35] YU X Y, LI J L, YANG M T, et al. Role of epigallocatechin gallate in collagen hydrogels modification based on physicochemical characterization and molecular docking[J]. *Food Chemistry*, 2021, 360: 130068.
- [36] ZHU L L, SUN X, FAN Y, et al. Effect of gallic acid and chlorogenic acid on physicochemical, microstructural and thermal degradation properties of ready-to-eat sea cucumber[J]. *Food Chemistry*, 2022, 380: 132186.