

高温处理对牛肉蛋白质组分及其降解的影响

Effects of high temperature treatment on protein components and their degradation in beef

邹良亮¹ 康怀彬^{1,2} 张慧芸^{1,2}

ZOU Liang-liang¹ KANG Huai-bin^{1,2} ZHANG Hui-yun^{1,2}

谢安国^{1,2} 蔡超奇¹ 王波¹

XIE An-guo^{1,2} CAI Chao-qi¹ WANG Bo¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023;

2. 食品加工与安全国家级实验教学示范中心, 河南 洛阳 471023)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Food Processing and Safety Education,

Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要:以不同高温处理(110, 115, 121 °C 分别加热 3, 6, 9, 12, 15 min)的牛背最长肌为研究对象, 分析其不同溶解性和不同结构蛋白质的含量, 总氮、非蛋白氮、氨基态氮的含量, 蛋白质水解指数以及全肌肉蛋白十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的变化规律。结果表明: 水溶性蛋白和盐溶性蛋白均随加热温度的升高和时间的延长而急剧下降, 121 °C 加热 15 min 后, 牛背最长肌中肌浆蛋白含量下降了 86.9%, 肌原纤维蛋白含量下降了 89.88%。总氮和氨基态氮含量均呈先升高后降低的趋势, 加热时间对非蛋白氮和蛋白水解指数影响显著($P < 0.05$), 200 kDa 的肌球蛋白重链电泳条带随着加热时间的延长逐渐变淡消失, 而 44.3 kDa 的肌动蛋白在整个高温处理过程中均无明显的变化。

关键词: 高温处理; 牛肉; 蛋白质组分; 蛋白质降解

Abstract: Beef longissimus dorsi muscle with different high temperature treatment (110 °C, 115 °C and 121 °C, respectively, heating 3, 6, 9, 12 and 15 min) were tested for time and temperature-related changes in different solubility and structural proteins, total nitrogen and non-protein nitrogen, amino nitrogen content, proteolysis index and SDS-PAGE patterns of total muscle protein during high temperature processing. The results showed that the contents of water-soluble protein and salt-soluble protein decreased distinctly with the increase of heating temperature and time. After heating at 121 °C for

15 min, the content of sarcoplasmic protein in the beef longissimus dorsi muscle was decreased by 86.9%, myofibrillar protein decreased by 89.88%. The content of total nitrogen and amino nitrogen increased first and then decreased. The effect of heating time on non-protein nitrogen and protein hydrolysis index was significant ($P < 0.05$). The myosin heavy chain band of 200 kDa gradually disappeared as the heating time prolonged, while the actin band of 44.3 kDa did not change significantly during the high temperature treatment.

Keywords: high temperature treatment; beef; protein components; protein degradation

高温肉制品是指加热介质温度高于 100 °C (通常为 115~121 °C), 中心温度高于 115 °C 并恒定适当时间的肉制品。由于蒸煮温度较高, 牛肉高温肉制品中细菌含量低甚至不含菌, 产品保质期长更适合流通, 并且具有营养卫生、携带方便等特点而深受消费者喜爱^[1]。而在高温处理过程中蛋白质的变性、降解和氧化对牛肉制品最终的品质起着重要作用。目前国内外对于蛋白质降解的研究多集中在干腌火腿、风鸭等加工过程中的变化, 如赵改名等^[2]研究了金华火腿在加工过程中蛋白质及游离氨基酸的变化。热处理方面也主要集中于煮制条件在 100 °C 以下的低温肉制品, 如顾伟刚等^[3]对 3 种猪肉汤体系中蛋白质降解产物进行了比较, 戴研等^[4]研究了欧姆加热对猪肉蛋白质降解的影响, 但是对于蛋白质组分的变化却未有相关研究报道。

而对于高温肉制品, 尤其是高温处理过程对牛肉蛋白质组分及其降解的影响尚未有过报道。因此本试验以不同处理温度及时间的牛背最长肌为研究对象, 通过对其不同溶解

基金项目: 河南省重大科技专项(编号: 161100110700)

作者简介: 邹良亮, 男, 河南科技大学在读硕士研究生。

通信作者: 康怀彬(1963—), 男, 河南科技大学教授, 硕士。

E-mail: khbin001@163.com

收稿日期: 2017—10—12

性和不同结构蛋白质的含量,总氮、非蛋白氮、氨基态氮的含量,蛋白质水解指数以及全肌肉蛋白质十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行研究分析,为牛肉高温肉制品的现代化工艺改进提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

牛背最长肌(取样前已排酸3 d):夏洛莱公牛(18月龄),河南伊赛牛肉股份有限公司;

三氯乙酸、磷酸氢二钠、溴酚蓝、异丙醇:分析纯,天津市德恩化学试剂有限公司;

丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、考马斯亮蓝 G250、考马斯亮蓝 R250、十二烷基磺酸钠(SDS):分析纯,美国 Sigma 公司;

牛血清白蛋白、羟脯氨酸:分析纯,上海伊卡生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

全自动凯氏定氮仪:K9860型,济南海能仪器股份有限公司;

紫外可见分光光度计:V-LS-30型,尤尼柯上海仪器有限公司;

高速分散均质机:FJ-200型,上海标本模型厂;

高速离心机:H1650型,长沙湘仪离心机仪器有限公司;

稳压稳流型电泳仪:DYY-6C型,北京市六一仪器厂;

凝胶成像仪:Gel-Doc-XR⁺型,美国 Bio-Rad 公司;

高压蒸气灭菌锅:TYAIB型,宁波久兴医疗器械有限公司;

无线温度传感器:Ellab-TrackSense-Pro型,丹麦 Ellab 公司。

1.3 方法

1.3.1 牛肉样品的预处理及高温处理 顺着肉样纹理,将牛背最长肌中肉眼可见的表面脂肪、夹层脂肪剔除干净,并修整切割成大小均匀的方形肉块(5 cm×5 cm×1 cm),用蒸煮袋真空密封包装,随后放入高压蒸气灭菌锅中进行高温处理。参考张莉莉^{[5]21}的方法,高温处理条件为:高压蒸气灭菌锅压力 0.12 MPa,当温度达到(110±1),(115±1),(121±1)℃后分别保持 3,6,9,12,15 min,高温处理后的牛肉样品静置冷却后放在 4℃冰箱冷藏待测。

1.3.2 牛肉样品高温处理传热曲线绘制 高温处理过程中,牛肉样品中心温度参考张莉莉^{[5]22}的方法,用无线 Ellab-TrackSense-Pro 温度传感器进行数据记录。

1.3.3 牛肉样品蛋白的提取

(1) 不同溶解性蛋白的提取:参照 Visessanguan 等^[6]的方法,并作适当修改,称取 1 g 左右(精确至 0.001 g)处理过的肉样,加入 10 倍体积 pH 3.0 盐酸溶液,10 000 r/min 均质 1 min,6 500 r/min 冷冻(4℃)离心 15 min,所得上清液即为酸性蛋白。另取 1 g 肉样,加入 10 倍体积预先冷却至 4℃的提取液 A(3.5 mmol/L 磷酸二氢钠,15.6 mmol/L 磷酸氢二钠,pH 7.0),10 000 r/min 均质 1 min,6 500 r/min 冷冻

(4℃)离心 15 min,此步骤重复 2 次,将上清液合并,沉淀备用。在上清液中加入 50%三氯乙酸至终浓度为 10%,6 500 r/min 冷冻(4℃)离心 15 min,所得沉淀即为水溶性蛋白。在第 1 次离心所得的沉淀中加入 10 倍体积预先冷却至 4℃的提取液 B(3.5 mmol/L 磷酸二氢钠,15.6 mmol/L 磷酸氢二钠,0.45 mol/L 氯化钠,pH 7.0),10 000 r/min 均质 1 min,8 500 r/min 冷冻(4℃)离心 15 min,此步骤重复 2 次,上清液合并即为盐溶性蛋白。所得沉淀中加入 10 倍体积的 0.1 mol/L 氢氧化钠,6 500 r/min 冷冻(4℃)离心 15 min,上清液即为碱性蛋白。

(2) 不同结构蛋白的提取:参考 Hashimo 等^[7]的方法,并作适当修改,称取 1 g 左右(精确至 0.000 1 g)处理过的肉样,加入 10 倍体积 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(3.5 mmol/L 磷酸二氢钠,15.6 mmol/L 磷酸氢二钠,0.45 mol/L 氯化钠,pH 6.5),10 000 r/min 均质 1 min,10 000 r/min 冷冻(4℃)离心 10 min,上清液即为肌浆蛋白。上述沉淀重新溶于 30 mmol/L pH 6.5 的磷酸盐缓冲液,10 000 r/min 均质 30 s,10 000 r/min 冷冻(4℃)离心 10 min,除去上清液,沉淀溶于 0.1 mol/L pH 6.5 的磷酸盐缓冲液,加入迭氮钠和碘化钾至最终浓度为 0.02%和 0.7 mol/L,10 000 r/min 冷冻(4℃)离心 10 min,所得上清液即为肌原纤维蛋白。胶原蛋白的提取参照 Eilert 等^[8]的方法,准确称取 1 g 肉样后加入 9 mL 25%的 Ringer 溶液,10 000 r/min 均质 1 min,55℃水浴 10 min,12 000 r/min 冷冻(4℃)离心 25 min,上清液即为胶原蛋白,此步骤重复 3 次。胶原蛋白含量测定参照 GB/T 9695.23—2008《肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定》,羟脯氨酸含量乘以 9.75 即为胶原蛋白含量。

1.3.4 蛋白质浓度的测定 采用考马斯亮蓝法。

1.3.5 总氮(TN)、非蛋白氮(NPN)、蛋白水解指数(PI)的测定

(1) 总氮:按 GB/T 5009.5—2003 执行。

(2) 非蛋白氮:参照赵改名等^[3]的方法,并作适当修改,称取 1 g 左右(精确至 0.000 1 g)肉样,加入 10 倍体积的 15%三氯乙酸,10 000 r/min 均质 1 min,25℃静置 1 h,6 500 r/min 冷冻(4℃)离心 15 min,取上清液过滤。

(3) 蛋白水解指数:总氮用凯氏定氮法测定,非蛋白氮用微量凯氏定氮法测定,按式(1)计算蛋白水解指数。

$$PI = \frac{NPN}{TN} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

PI——蛋白水解指数,%;

NPN——非蛋白氮含量,%;

TN——总氮含量,%。

1.3.6 氨基态氮含量的测定 按 ZB X 66038—87 执行。

1.3.7 全肌肉蛋白 SDS-PAGE 电泳

(1) 全肌肉蛋白的提取:参考 Bechtel 等^[9]的方法,称取 1 g 左右(精确至 0.000 1 g)处理过的肉样,加入 10 mL 提取液(10 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄,1% SDS,pH 7.0),11 000 r/min 均质 1 min,4℃静置 1 h,10 000 r/min 冷冻

(4 ℃)离心 15 min,所得上清液即为全肌肉蛋白溶液。

(2) SDS-PAGE 电泳:采用 Laemmli^[10] 的电泳体系,并参考姜启兴^{[11]50} 的方法,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%。

1.4 数据处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 牛肉高温处理传热曲线

将牛背最长肌置于高压蒸汽灭菌锅中,待温度分别达到 (110±1), (115±1), (121±1) ℃ 时绘制高温处理传热曲线,结果见图 1。在加热前 20 min,牛肉中心部位温度急剧上升,并迅速接近至加热介质温度,升温速率不断增加。而在加热后期则升温速率明显变缓,可能是随着温度的升高,牛肉表面的蛋白质变性产生了不溶性的凝胶,阻碍了热量从牛肉表面向中心部位传递^{[5]23}。

2.2 不同溶解性、不同结构蛋白质含量的变化

由表 1 可知,在原料牛背最长肌不同溶解性蛋白中,含量最高的为碱溶性蛋白,占 7.13%,不同结构蛋白含量最高的是肌原纤维蛋白,为 87.21 mg/g。水溶性蛋白含量在加热初期与原料相比显著降低($P<0.05$),并随温度的升高和时间的延长呈下降趋势,可能是由于水溶性的肌浆蛋白变性导致的。121 ℃ 加热 15 min 后,水溶性蛋白较原料下降了 57.37%。

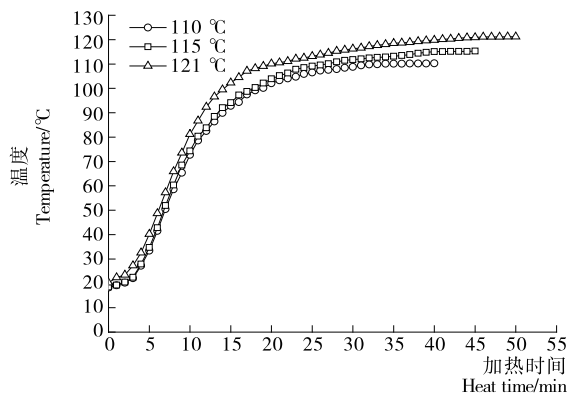


图 1 不同处理温度下牛肉的传热曲线

Figure 1 Heat transfer curves of beef at different treatment temperatures ($n=3$)

盐溶性蛋白含量的变化趋势与水溶性蛋白相似,与孙丽等^[12]研究的蒸煮对金枪鱼蛋白质热变性的结果一致,可能是盐溶性的肌原纤维蛋白受热降解造成的。酸溶性蛋白含量随着加热时间的延长先下降后轻微上升,差异不显著($P>0.05$)。碱溶性蛋白含量在 110 ℃ 时,随着加热时间的延长而升高,而在 115, 121 ℃ 时呈先升高后下降、最后增加的趋势。碱溶性蛋白在加热后期含量增加主要是由肌浆蛋白和肌原纤维蛋白受热变性生成了不溶于水 and 盐溶液但溶于 0.1 mol/L NaOH 溶液的凝结核造成的。

表 1 处理温度和处理时间对牛背最长肌蛋白质含量的影响[†]

Table 1 Effects of different treatment temperature and time on the content of beef longissimus dorsi muscle protein ($n=3$)

温度/ ℃	时间/ min	不同溶解性蛋白				不同结构蛋白		
		水溶性蛋白/ %	盐溶性蛋白/ %	酸溶性蛋白/ %	碱溶性蛋白/ %	肌浆蛋白/ (mg·g ⁻¹)	肌原纤维蛋白/ (mg·g ⁻¹)	胶原蛋白/ (mg·g ⁻¹)
110	0	3.73±0.17 ^a	7.09±0.53 ^a	4.65±0.39 ^a	7.13±0.56 ^a	49.21±3.62 ^a	87.21±5.32 ^a	6.72±0.47 ^a
	3	1.57±0.11 ^c	2.13±0.18 ^d	2.39±0.24 ^b	2.39±0.21 ^d	13.27±1.62 ^b	11.32±1.77 ^b	4.09±0.32 ^b
	6	1.48±0.09 ^c	2.48±0.16 ^c	1.81±0.19 ^d	2.52±0.23 ^{cd}	11.13±1.57 ^c	10.47±1.69 ^b	3.68±0.29 ^c
	9	1.76±0.13 ^b	2.44±0.17 ^c	1.47±0.15 ^e	2.65±0.19 ^{bc}	8.04±1.52 ^d	10.53±1.63 ^c	3.33±0.27 ^d
	12	1.78±0.07 ^b	2.73±0.19 ^b	1.92±0.18 ^d	2.68±0.25 ^b	7.65±1.61 ^d	9.69±1.42 ^c	3.29±0.29 ^{de}
115	0	3.73±0.17 ^a	7.09±0.53 ^a	4.65±0.39 ^a	7.13±0.56 ^a	49.21±3.62 ^a	87.21±5.32 ^a	6.72±0.47 ^a
	3	1.62±0.11 ^c	2.31±0.21 ^c	1.59±0.16 ^b	2.42±0.23 ^c	11.91±1.63 ^b	10.98±1.71 ^b	5.29±0.41 ^b
	6	1.30±0.07 ^d	1.80±0.19 ^d	1.65±0.13 ^b	2.50±0.26 ^{bc}	10.32±1.56 ^c	10.03±1.65 ^b	3.95±0.32 ^c
	9	1.10±0.05 ^e	1.81±0.16 ^d	0.95±0.11 ^d	2.57±0.19 ^b	7.96±1.69 ^d	9.92±1.59 ^b	3.19±0.25 ^c
	12	1.25±0.06 ^d	1.78±0.13 ^d	1.18±0.12 ^c	1.81±0.16 ^e	7.15±1.53 ^{de}	9.41±1.53 ^b	3.39±0.28 ^d
121	0	3.73±0.17 ^a	7.09±0.53 ^a	4.65±0.39 ^a	7.13±0.56 ^a	49.21±3.62 ^a	87.21±5.32 ^a	6.72±0.47 ^a
	3	1.60±0.12 ^b	2.18±0.17 ^b	1.51±0.14 ^b	2.26±0.22 ^b	11.73±1.73 ^b	10.87±1.73 ^b	3.82±0.33 ^b
	6	1.25±0.09 ^{cd}	1.82±0.13 ^c	1.52±0.16 ^b	2.34±0.24 ^b	8.41±1.59 ^c	9.45±1.61 ^b	3.32±0.29 ^d
	9	1.18±0.07 ^d	1.82±0.16 ^c	1.15±0.11 ^c	2.41±0.18 ^b	7.04±1.48 ^d	9.24±1.58 ^b	3.57±0.31 ^c
	12	1.33±0.11 ^c	1.62±0.14 ^d	1.24±0.13 ^c	1.77±0.16 ^c	6.67±0.99 ^d	8.91±1.42 ^c	3.04±0.24 ^e
15	1.59±0.14 ^b	1.69±0.19 ^{cd}	1.14±0.09 ^c	1.84±0.14 ^c	6.43±0.87 ^d	8.83±1.46 ^b	3.21±0.26 ^{de}	

† 同列上标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

肌浆蛋白和肌原纤维蛋白含量均随温度的升高和时间的延长而快速下降,121℃加热15min后,肌浆蛋白含量下降了86.9%,肌原纤维蛋白含量下降了89.88%。肌浆蛋白和肌原纤维蛋白受热变性降解成小分子的蛋白质或多肽和游离氨基酸,从而导致了其含量急剧下降^[13]。随着加热时间的延长,胶原蛋白含量先下降后基本保持平缓,加热初期下降主要是胶原蛋白随着加热温度的升高和时间的延长而降解成小分子蛋白,甚至进一步降解成明胶而溶出,而加热后期保持平缓是因为胶原蛋白全部变成了可溶性的胶原。Kong等^[14]在研究鲑鱼时也发现,当加热到121.1℃时,90%的胶原已经溶出。

2.3 总氮、非蛋白氮及蛋白水解指数的变化

总氮、非蛋白氮及蛋白水解指数的变化可以客观地反映牛背最长肌在高温处理过程中蛋白质的降解,结果见表2。

牛背最长肌经高温处理后总氮含量显著升高($P < 0.05$),并在110℃加热9min时达到最大值(14.02%)。随着处理温度的升高,总氮含量呈下降的趋势,可能是由部分水溶性含氮物质溶解到渗出液中,或者部分挥发性含氮物的损失造成的。在高温处理初期非蛋白氮含量均显著升高($P < 0.05$),加热6min后变化不显著($P > 0.05$)。高温处理15min后,110,115℃条件下的非蛋白氮含量相差不大。110,115℃时,非蛋白氮含量均先上升后下降,主要是因为游离氨基酸和多肽分子的聚集,其中水溶性氨基酸和肽类分

表2 处理温度和处理时间对牛背最长肌总氮、非蛋白氮及蛋白水解指数的影响[†]

Table 2 Effects of different treatment temperature and time on TN, NPN and PI of beef longissimus dorsi muscle ($n=3$)

温度/℃	时间/min	总氮/%	非蛋白氮/%	蛋白水解指数/%
110	0	10.51±0.39 ^c	0.40±0.05 ^c	3.77±0.23 ^d
	3	12.85±0.41 ^c	0.52±0.07 ^b	4.02±0.25 ^c
	6	13.21±0.47 ^b	0.54±0.08 ^b	4.11±0.27 ^c
	9	14.02±0.41 ^a	0.62±0.06 ^a	4.46±0.18 ^b
	12	12.35±0.44 ^d	0.60±0.04 ^{ab}	4.88±0.15 ^a
	15	12.78±0.58 ^c	0.52±0.06 ^b	4.03±0.19 ^c
115	0	10.51±0.39 ^c	0.40±0.05 ^c	3.77±0.23 ^d
	3	12.92±0.41 ^b	0.49±0.06 ^b	3.78±0.16 ^d
	6	12.13±0.34 ^d	0.53±0.04 ^b	4.34±0.25 ^b
	9	12.49±0.31 ^c	0.57±0.05 ^{ab}	4.58±0.27 ^a
	12	13.41±0.45 ^a	0.61±0.07 ^a	4.52±0.19 ^a
	15	13.33±0.42 ^a	0.53±0.05 ^b	3.98±0.18 ^c
121	0	10.51±0.39 ^d	0.40±0.05 ^b	3.77±0.23 ^e
	3	12.51±0.31 ^c	0.63±0.07 ^a	5.01±0.28 ^b
	6	13.07±0.29 ^b	0.55±0.04 ^{ab}	4.24±0.21 ^d
	9	12.92±0.28 ^b	0.58±0.06 ^a	4.52±0.26 ^c
	12	13.65±0.35 ^a	0.61±0.08 ^a	4.46±0.19 ^c
	15	10.29±0.25 ^d	0.61±0.05 ^a	5.94±0.27 ^a

† 同列上标字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

子转移到渗出液中,使牛肉样品中非蛋白氮的含量降低^[15]。在121℃时非蛋白氮含量先上升后下降再趋于平缓,与常亚楠^[16]研究煮制条件对鸡腿中总氮和非蛋白氮含量影响的结果相一致。蛋白水解指数随加热温度的升高和时间的延长先升高后下降,牛背最长肌在加热初期蛋白水解指数变化显著($P < 0.05$)。高温处理9min时,115℃条件下的蛋白水解指数比110,121℃条件下的都大,为4.58%;而在高温处理15min时,121℃条件下的蛋白水解指数达到最大值(5.94%)。随着高温处理过程的不断进行,在加热后期蛋白水解指数呈下降趋势,可能是牛肉中水分活度不断降低、pH值发生改变以及离子浓度的升高阻碍了蛋白质的分解。

2.4 氨基态氮含量的变化

不同高温处理后的牛背最长肌氨基态氮含量见图2。

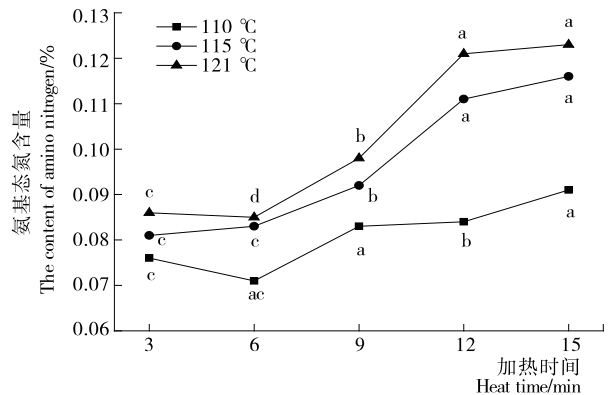


图2 处理温度和处理时间对牛背最长肌氨基态氮含量的影响

Figure 2 Effects of different treatment temperature and time on content of amino nitrogen in beef longissimus dorsi muscle ($n=3$)

随着加热时间的延长,牛背最长肌中氨基态氮含量呈现上升趋势($P < 0.05$),蛋白质水解作用不断增强。相同加热时间下,温度越高,氨基态氮含量越高,表明在较高的温度下,蛋白质的一级结构被破坏,蛋白质发生降解并且其肽键断裂,从而使得游离的氨基增多^[17]。随着加热时间延长,氨基态氮含量呈现先平缓后上升后基本平衡的趋势($P > 0.05$),110℃较115,121℃条件下增长趋势缓和,氨基态氮含量最终分别增加了0.015%,0.035%,0.037%。这与姜启兴^[11]研究鲷鱼肉加工特性时的结果基本一致,主要是因为牛背最长肌中含有较大分子量的肌原纤维蛋白和胶原蛋白,而且肌纤维直径大密度小,受热冲击强烈,从而在加热过程中随温度的升高释放出更多的游离氨基。

2.5 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

将不同高温处理后的牛背最长肌全肌肉蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,结果见图3。

由图3可知,随着处理温度的升高和加热时间的延长,牛背最长肌中蛋白质发生了降解聚集从而导致许多电泳条带消失以及新条带产生。结合图3(b)可知,加热处理后的牛背最长肌相较于生鲜牛肉的电泳条带,在200.0~66.4 kDa和44.3~29.0 kDa条带范围内出现了明显的模糊变淡现象,

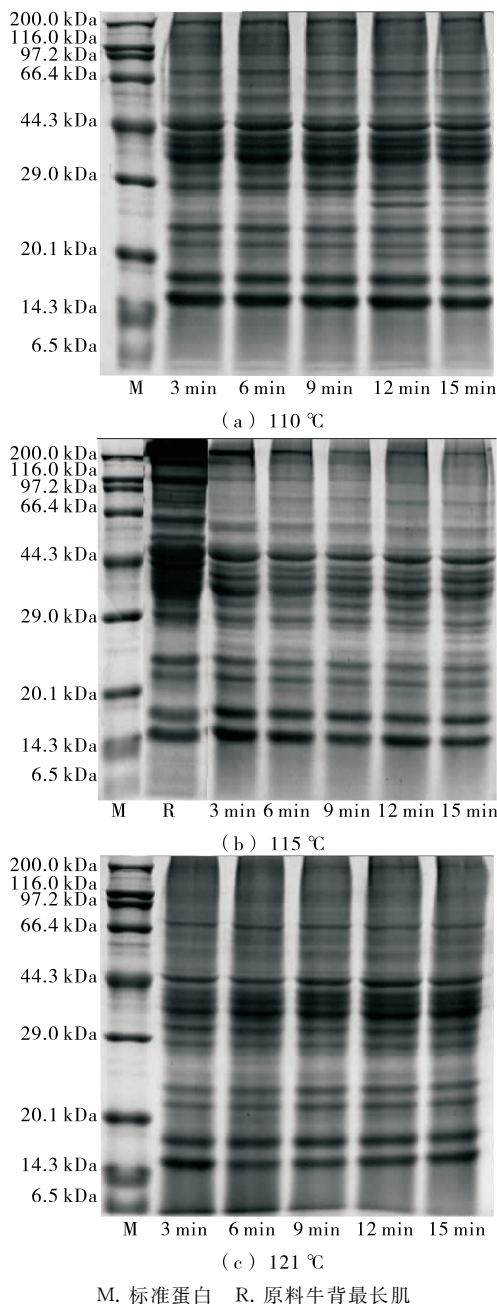


图 3 不同处理温度和处理时间的牛背最长肌全肌肉蛋白 SDS-PAGE 图

Figure 3 SDS-PAGE of proteins from beef longissimus dorsi muscle at different treatment temperature and time

表明蛋白质发生了高度降解。200.0 kDa 的肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MHC) 随着加热温度的升高和时间的延长逐渐变淡,而在 121 °C 加热时则完全消失,与 Jiraporn Runglerdkriangkrai 等^[18]研究鱼丸高温杀菌时,发现 116 °C 加热 3 min 时, MHC 条带明显变浅,加热至 6 min 时则几乎完全消失的结果基本一致。而 29.0~44.3 kDa 的蛋白质只在加热初期发生了轻微降解,44.3 kDa 的肌动蛋白在整个高温处理过程中都无明显的变化,表明肌动蛋白比肌球蛋白的热稳定性明显要高,与 Tornberg 等^[19]在鸡肉加热过程中发

现肌动蛋白电泳条带比肌球蛋白条带消失更慢的结果相一致。随着处理温度的升高和时间的延长, MHC 电泳条带上部的颜色会加深,可能是高温使蛋白质发生了过度聚合变性,产生了聚集现象。

3 结论

(1) 在高温处理过程中,牛背最长肌中的蛋白质高度降解,蛋白质组分发生了明显变化。水溶性蛋白和盐溶性蛋白均随加热温度的升高和时间的延长而急剧下降,胶原蛋白含量先下降后基本保持平稳。121 °C 加热 15 min 后,牛背最长肌中肌浆蛋白含量下降了 86.9%,肌原纤维蛋白含量下降了 89.88%。

(2) 随着加热时间的延长总氮含量呈先升高后降低的趋势,并在 110 °C 加热 9 min 时达到最大值,为 14.02%。加热温度对非蛋白氮和蛋白水解指数影响不显著 ($P > 0.05$),而加热时间则对其影响显著 ($P < 0.05$)。随着加热时间的延长氨基态氮含量呈上升的趋势,110 °C 较 115, 121 °C 条件下增长趋势缓和,最终分别增加了 0.015%, 0.035%, 0.037%。

(3) 牛背最长肌中 200 kDa 的肌球蛋白重链条带随着加热时间的延长逐渐变淡消失,并在 200~66.4 kDa 和 44.3~29.0 kDa 条带范围内表现出明显的模糊变淡,而 44.3 kDa 的肌动蛋白在整个高温处理过程中均无明显的变化。

参考文献

- [1] 刘爱萍. 高温肉制品的归属与管理[J]. 肉类工业, 2009(1): 51-54.
- [2] 赵改名, 周光宏, 柳艳霞, 等. 肌肉非蛋白氮和游离氨基酸在金华火腿加工过程中的变化[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 33-37.
- [3] 顾伟钢, 张进杰, 姚燕佳, 等. 3 种猪肉汤体系中蛋白质降解产物的比较研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(2): 178-185.
- [4] 戴妍. 欧姆加热对猪肉蛋白质降解、氧化以及凝胶特性的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2014: 6-10.
- [5] 张莉莉. 高温(100~120 °C)处理对鱼糜及其复合凝胶热稳定性的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [6] VISESSANGUAN W, BENJAKUL S, RIEBROY S, et al. Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics[J]. Meat Science, 2004, 66(3): 579-588.
- [7] HASHIMOTO K, WATABE S, KONO M, et al. Muscle protein composition of sardine and mackerel[J]. Nsugaf, 1979, 45(11): 1 435-1 441.
- [8] EILERT S J, MANDIGO R W. Procedure for soluble collagen in thermally processed meat products[J]. Journal of Food Science, 2010, 58(5): 948-949.
- [9] BECHTEL P J, FCJR P. Effects of postmortem storage and temperature on muscle protein degradation: analysis by SDS gel electrophoresis[J]. Journal of Food Science, 1983, 48(1): 294-295.
- [10] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227 (5 259): 680-685.

(下转第 27 页)

表 5 菌液处理烟叶后感官质量评价结果[†]

Table 5 Evaluation of sensory quality after treatment of tobacco leaves with bacterial fluid

样品	香气质 A	香气量 B	浓度 C	柔细度 D	余味 E	杂气 F	刺激性 G	总分 T
发酵后	5.89	5.86	5.89	6.27	5.79	5.77	6.23	59.92
CK	5.78	5.77	5.75	6.16	5.67	5.68	6.09	58.79

[†] $T=(A+B) \times 2.3+C \times 1.5+D+E+F+G$ 。

3 结论

本研究从不同类型复烤烟叶样品中分离出 18 株蛋白质降解菌株,观察其在蛋白质降解菌选择培养基上生长 48 h 和 72 h 降解蛋白质的情况可知,HN-3、HN-4、YN-6、YN-10、YN-13、FJ-18 降解蛋白的能力较强。进一步测定菌株蛋白质酶活力表明,6 种菌株的蛋白酶活性分别为 3 417,2 217,3 246,2 789,2 217,3 017 U/mL,蛋白酶活力最高的菌株是在蛋白质降解菌选择培养基上生长快且透明圈与菌落直径比值较大的 HN-3。

通过 16Sr DNA 测序,HN-3 与短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)的同源性高达 100%,亲缘关系最近,结合形态学与理化特性,参考《伯杰细菌鉴定手册》,确定 HN-3 为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。在之前的研究中,黄静文等^[17]从烤烟表面分离到 1 株短小芽孢杆菌 Van35,将其制成菌液施用于卷烟烟丝,22 °C 于 60% 恒温恒湿箱发酵 20 d,结果表明,烟叶纤维素含量、总氮均明显降低,短小芽孢杆菌处理后的烟叶,烟香、细腻醇均明显提升,烟叶刺激性、杂气均明显下降,但未报道短小芽孢杆菌 Van35 是否具有降解烟叶中蛋白质的功能。本研究将由 HN-3 制成的菌液喷施于烟叶表面,烟叶中蛋白质降解率可达 29.66%,证明短小芽孢杆菌 HN-3 能有效降解烟叶中的蛋白质,且能显著改善烟叶的整体感官质量。综合之前研究可推测短小芽孢杆菌可有效降解烟叶中蛋白质、纤维素等大分子物质,减少这些大分子物质在烟叶燃烧时产生的刺激气体等,从而有效改善烟叶的吸食品质,相关结果有待进一步验证。

参考文献

- [1] 谢建平. 烟草与烟气化学成分[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 7-8.
- [2] 肖明礼, 杨庆, 林锐峰, 等. 风味蛋白酶提升烟叶抽吸品质的研

究[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(1): 181-185.

- [3] 胥海东, 王永泽, 王金华. 津巴布韦烟叶中淀粉酶和蛋白酶产生菌的分离及鉴定[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(4): 536-539.
- [4] 冯志珍, 陈太春, 胡喜怀, 等. 烟叶表面高效降解蛋白质芽孢杆菌的分离筛选及其鉴定[J]. 中国烟草学报, 2012, 18(1): 101-105.
- [5] 阮祥稳, 任平陈, 卫锋. 酶对烟叶发酵内在品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 67-68.
- [6] 谢会雅, 朱列书, 刘艳丽, 等. 利用酶制剂降解烤烟烟叶中淀粉和蛋白质的研究[J]. 中国烟草科学, 2008, 29(6): 23-26.
- [7] 丁冉, 马宇平, 周浩, 等. 烟草中蛋白质研究概述[J]. 广州化工, 2014, 42(5): 5-8, 26.
- [8] 陶文沂. 中国食品工业发展及新技术的应用[J]. 食品与机械, 2006, 22(4): 3-9.
- [9] 李梅云, 高家合, 王革, 等. 微生物对烟叶蛋白质含量的影响[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 376-380.
- [10] 马玲玲. 同时高效降解烟叶中淀粉和蛋白质菌株的分离鉴定及其对烟叶理化成分的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [11] 陈兴, 汪显国, 曾晓鹰, 等. 蛋白降解菌的筛选及其在烟叶中的作用效果研究[J]. 江西农业学报, 2015, 27(6): 90-91.
- [12] 卫春会, 黄治国, 黄丹, 等. 高温大曲高产蛋白酶菌株的分离鉴定及其产酶性能研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 24-29.
- [13] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 162-163.
- [14] 陈瑾, 邵冰洁, 朱晓昊, 等. 糯米炸糕中发酵细菌鉴定与优势菌株筛选[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 33-36, 91.
- [15] 朱大恒, 李彩霞. 烟气有害成分与烟叶化学成分的关系[J]. 烟草科技, 1999(4): 25-27.
- [16] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 274-442.
- [17] 黄静文, 段焰青, 者为, 等. 短小芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 烟草科技, 2010(8): 61-64.

(上接第 22 页)

- [11] 姜启兴. 鲮鱼肉热加工特性及其机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [12] 孙丽, 夏文水. 蒸煮对金枪鱼肉及其蛋白质热变性的影响[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 22-25.
- [13] 章建浩, 朱健辉, 王思凡, 等. 金华火腿工艺过程蛋白质水解及其相关性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 173-177.
- [14] KONG Fan-bin, TANG Ju-ming, RASCO B, et al. Kinetics of salmon quality changes during thermal processing[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 83(4): 510-520.
- [15] 戚巍威, 徐为民, 徐幸莲, 等. 传统风鸭加工过程中非蛋白氮和

- 游离氨基酸的变化[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(2): 190-193.
- [16] 常亚楠. 煮制条件对卤鸡腿蛋白降解影响的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014: 37-42.
- [17] 张平, 杨勇, 曹春廷, 等. 食盐用量对四川腊肉加工及贮藏过程中肌肉蛋白质降解的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 67-72.
- [18] JIRAPORN Runglerdkriangkrai, KRIANGSAK Balue, NON-GNUCH Raksakulthai. Quality of fish ball from surimi as affected by starch and sterilizing conditions[J]. Kasetsart University Fisheries Research Bulletin, 2008, 32(1): 39-47.
- [19] TORNBERG E. Effects of heat on meat proteins-Implications on structure and quality of meat products[J]. Meat Science, 2005, 70(3): 493.