

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.10.035

# 绿豆清蛋白 Osborne 分级提取工艺 优化及亚基组成分析

## Optimization on Osborne extracting process for mung bean albumin and its subunit strip determination

张舒<sup>1,2</sup> 王长远<sup>1,2</sup> 谭朝印<sup>1</sup> 冯玉超<sup>1</sup>ZHANG Shu<sup>1,2</sup> WANG Chang-yuan<sup>1,2</sup> TAN Zhao-yin<sup>1</sup> FENG Yu-chao<sup>1</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319; 2. 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319)

(1. Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

2. National Cereals Engineering Technology Research Center, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

**摘要:**以绿豆为原料,采用 Osborne 分级法从绿豆中提取清蛋白,在单因素试验基础上,用  $L_9(3^4)$  正交试验,研究提取温度、提取时间和料液比对绿豆清蛋白提取率的影响,并采用 SDS-PAGE 电泳分析绿豆清蛋白的亚基组成。结果表明,绿豆清蛋白的最佳提取工艺为料液比 1:10 (g/mL)、提取温度 45 °C、提取时间 150 min,该条件下绿豆清蛋白的提取率为  $(86.79 \pm 0.31)\%$ ,清蛋白纯度为 88.33%。提取的绿豆清蛋白中有 4 条亚基条带,分子量分别为 56.2, 46.8, 26.3, 21.9 kD。

**关键词:**绿豆;清蛋白;Osborne 分级法;亚基条带

**Abstract:** Taking the mung beans as raw materials, the Osborne classification method was used to extract albumin from mung bean. Based on the single factor test, using the  $L_9(3^4)$  orthogonal test, the effects were studied, from the extraction temperature, extraction time and ratio of material to liquid on the extraction rate of mung bean albumin. The subunit composition of mung bean albumin was analyzed by SDS-PAGE. The results showed that the optimal extraction process of mung bean albumin were: ratio of solid to liquid of 1:10 (g/mL), extraction temperature of 45 °C, extraction time of 150 min. Under this condition, the extraction rate of mung bean albumin was  $(84.79 \pm 0.31)\%$ . The purity of the albumin was 88.33%. There are 4 subunit bands in the extracted mung bean albumin. The

molecular weights of the 4 subunit were 56.2, 46.8, 26.3, and 21.9 kD, respectively.

**Keywords:** mung beans; albumin; Osborne classification method; subunit band

绿豆属于豆科类,又名青小豆、植豆等<sup>[1]</sup>,在东亚各国广泛种植。2015年11月,农业农村部提出适时发展杂粮杂豆等经济作物,为中国绿豆的发展提供了更好的前景<sup>[2]</sup>。绿豆中含有蛋白质、碳水化合物、脂肪、钙及多种矿物质元素,其中蛋白质含量为 24% 左右<sup>[3]</sup>,是制备优质蛋白的良好原材料<sup>[4]</sup>。绿豆是众多豆类中蛋白质含量比较丰富的一种,含有的氨基酸种类齐全,如异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸和蛋氨酸等必需氨基酸,并且蛋白质的功效极好<sup>[5]</sup>,其中绿豆清蛋白具有优良的溶解性、持水性、乳化性等,在食品工业中发挥着重要作用<sup>[6-7]</sup>。

绿豆的应用大多还停留在传统的模式上,近年来才逐渐重视并加大对绿豆的使用和研究。并且大部分研究集中于绿豆总蛋白及其功能性质<sup>[8-9]</sup>,加工后绿豆蛋白的结构功能性质的改变<sup>[10-11]</sup>,以及对绿豆分级蛋白含量和功能性质<sup>[12]</sup>方面,但对于绿豆清蛋白的提取工艺优化并不多,且提取时间较长<sup>[13]</sup>。因此试验拟采用 Osborne 分级法,从绿豆中提取清蛋白,研究料液比、提取温度和提取时间对清蛋白提取率的影响,并分析绿豆清蛋白亚基组成,为绿豆清蛋白结构研究及精深加工提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 试验材料

绿豆:市售;

盐酸、氢氧化钠:分析纯,天津市北联精细化学品开发有限公司;

**基金项目:**黑龙江省自然科学基金项目(编号:LH2019C054);黑龙江省博士后基金项目(编号:LBH-Z15217);黑龙江省农垦总局科技项目(编号:HNK135-05-01);国家十三五支撑计划(编号:2017YFD0401203)

**作者简介:**张舒,女,黑龙江八一农垦大学在读硕士研究生。

**通信作者:**王长远(1976—),男,黑龙江八一农垦大学教授,博士。

E-mail: byndwcy@163.com

收稿日期:2019-04-23

SDS-PAGE 凝胶试剂盒:碧云天生物技术有限公司;  
蛋白 Marker(SM0431),北京索莱宝科技有限公司;  
考马斯亮蓝(G250):天津市科密欧化学试剂厂。

## 1.2 主要仪器

精密 pH 计:DELTA 320 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

凯氏定氮仪:SKDA-800 型,上海沛欧分析仪器有限公司;

冷冻干燥机:Alpha 1-2 LD plus 型,德国 CHRISTA 公司;

紫外—可见分光光度计:A360 型,翱艺仪器(上海)有限公司;

电泳仪:Mini-Protean 4 型,美国 Bio-Rad 公司。

## 1.3 试验方法

1.3.1 绿豆清蛋白的提取工艺 精选绿豆除杂后经高速粉碎机粉碎,过 60 目筛,制成绿豆粉样品。绿豆粉和石油醚以 1:5(g/mL)的液料比在室温下每次均匀搅拌 5 h,进行 2~3 次脱脂处理后,得到脱脂绿豆粉。采用 Osborne 分级法的第一步,将 100 g 脱脂绿豆粉与蒸馏水按一定比例混合后,在适合的水浴温度下进行搅拌一段时间后,在 4 000 r/min 的条件下离心 20 min,调节所取上清液的 pH 值至绿豆清蛋白等电点,使蛋白沉淀,静止 30 min 后以同样转速离心 20 min,取沉淀,使其在真空度 0.03~0.08 kPa、-50 °C 的参数下冷冻干燥,并于 -20 °C 条件下保存备用。

### 1.3.2 单因素试验设计

(1) 料液比:称取 80 g 脱脂绿豆粉样品放置在烧杯中,加入不同比例的水,设置水浴的提取温度为 40 °C,搅拌时间为 120 min。提取完成后用台式低速离心机离心样液,取上清液做样品测定,于 650 nm 下测样品的吸光度,计算提取率。

(2) 提取温度:称取 80 g 脱脂绿豆粉,加入蒸馏水的比例为 1:10 (g/mL),在 30~50 °C 的水浴温度中搅拌加热 120 min,温度梯度间距设定为 5 °C。提取完成后用台式低速离心机离心样液,取上清液进行浓度测定,测量吸光度,计算提取率。

(3) 提取时间:称取 80 g 脱脂绿豆粉,豆粉与蒸馏水的比例为 1:10 (g/mL),在水浴温度为 40 °C 的水浴锅中水浴加热 60~180 min,时间梯度间距设定为 30 min。提取完成后离心样液,取上清液进行浓度测定,测量吸光度,计算提取率。

1.3.3 正交试验 依据单因素试验结果,以绿豆清蛋白的提取率为评价指标,设计正交试验。

1.3.4 提取液中蛋白质浓度的测定 采用福林酚法。

(1) 碱性铜溶液配置:称取 2.500 g NaOH、12.500 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,溶于 100 mL 蒸馏水中,备用。称取 0.125 g 酒

石酸钾溶于 12.5 mL 蒸馏水中,准确称取 0.062 5 g 硫酸铜溶于 7.5 mL 蒸馏水中,备用(使用前合并配置的溶液)。

(2) 牛血清蛋白标准曲线的绘制:采用贺建华等<sup>[14]</sup>的试验方法,用牛血清蛋白(250 μg/mL)分别配置 0.00, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 mg/mL 的牛血清蛋白溶液,各取 1.0 mL 试液放置在试管(25 mL)中,标号 0~6,取 1.0 mL 碱性铜溶液和 4.0 mL 福林酚试液于各试管中,摇匀。于 55 °C 水浴中放置 5 min,后再于冷水中放置 10 min,反应结束后以 0 号试管为空白对照测吸光度(650 nm)。

(3) 样品的测定:取一支试管加入 1.0 mL 样品溶液、1.0 mL 碱性铜溶液和 4.0 mL 福林酚试液,快速混匀。于 55 °C 水浴中放置 5 min,再于冷水中放置 10 min,测吸光度(650 nm)。

1.3.5 清蛋白提取率的测定 根据 1.3.1 的提取方法冷冻干燥获得清蛋白后,将其复溶于一定量的蒸馏水中采用上述方法测蛋白质浓度,按式(1)计算清蛋白的提取率。

$$Y = \frac{c \times v}{m_1 \times m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——清蛋白提取率,%;

c——提取液蛋白质浓度,g/mL;

v——提取液体积,mL;

m<sub>1</sub>——样品蛋白质含量,g。

m<sub>2</sub>——样品取样量,g。

1.3.6 等电点的测定 测定调节 pH 后的上清液浓度,根据等电点处溶解性最低的原理以浓度最低值即吸光度值最小为绿豆清蛋白等电点。

1.3.7 蛋白纯度的测定 采用凯氏定氮法。参考李永武<sup>[13]</sup><sup>20</sup>的方法,并选择适当条件进行测定:称取 1 g 蛋白质样品于锥形瓶内,加 0.5 g Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、10 g KSO<sub>4</sub>和 20 mL 浓硫酸,摇匀后加热使瓶内液体持续轻微沸腾。当溶液的颜色变为清澈的蓝绿色溶液后,恒温处理 30 min 后冷却,于 100 mL 容量瓶中定容备用。样品冷却后使用半自动凯氏定氮仪蒸馏,蒸馏结束后用 0.01 mol/L 的盐酸标准溶液滴定,当溶液的颜色变为微红色时停止滴定,并记录所用盐酸的量。按式(2)计算蛋白质的质量分数。

$$W = \frac{c \times (V_2 - V_1) \times 0.014 \times F}{m \times \frac{10}{100}} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

W——蛋白质的质量分数,%;

c——盐酸标准溶液的浓度,mol/L;

V<sub>1</sub>——空白滴定消耗标准液量,mL;

$V_2$ ——试剂滴定消耗标准液量, mL;  
 $m$ ——样品质量, g;  
 0.014——氮的毫摩尔质量;  
 $F$ ——蛋白质系数。

1.3.8 绿豆清蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 将提取的绿豆蛋白质溶解, 配制浓度为 0.5 mg/mL 的蛋白溶液, 加入等量的上样缓冲液 (0.25 mol/L Tris-HCl, 10% SDS, 0.5% 溴酚蓝, 50% 甘油, 5%  $\beta$ -巯基乙醇), 于沸水浴中加热 5 min。配制浓度分别为 12%, 5% 的分离胶和浓缩胶, 电泳上样量 10  $\mu$ L。样品冷却后, 设定电压 80 V, 开始电泳, 当条带至分离胶低端处时电泳结束。使用考马斯亮蓝 R250 进行染色, 染色完成后使用洗脱液脱色。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准曲线

如图 1 所示, 牛血清蛋白的标准曲线方程为  $y = 1.7274x - 0.0028$ , 决定系数  $R^2 = 0.9989$ 。结果表明, 该标准曲线具有良好的线性关系。

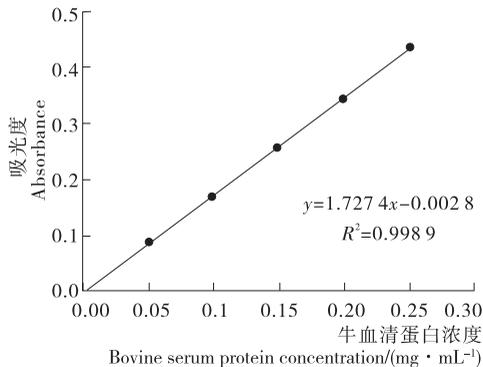


图 1 标准曲线图

Figure 1 Standard curve

### 2.2 等电点的测定

由图 2 可知, pH 为 4.5 时, 吸光度值最低, 此时蛋白沉淀量最高, 故以此 pH 值为绿豆清蛋白的等电点。

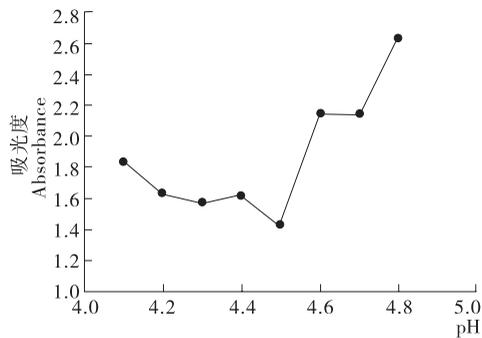


图 2 不同 pH 值条件下的绿豆清蛋白溶液吸光度值

Figure 2 The relationship between the absorbance value of albumin and pH value

### 2.3 提取工艺的优化

2.3.1 料液比的影响 由图 3 可知, 在料液比为 1 : 6 ~ 1 : 10 (g/mL) 时提取率呈上升趋势, 可能是蛋白质随溶剂的增加而逐渐溶解出来, 提取率上升<sup>[15]</sup>; 当料液比超过 1 : 10 (g/mL) 后提取率呈现下降趋势, 可能是水量过多导致酸沉时上清液中清蛋白的溶解量变大, 造成蛋白损失, 提取率下降<sup>[16]</sup>。选用 3 个提取率最高时所对应的料液比值作为正交因素水平, 即 1 : 8, 1 : 10, 1 : 12 (g/mL)。

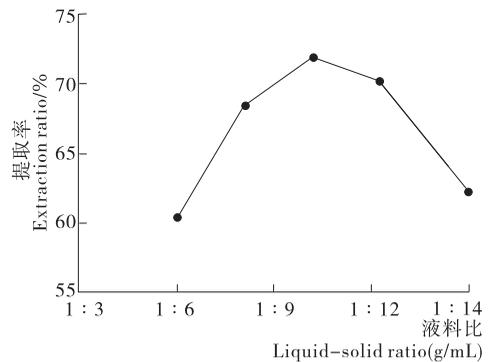


图 3 料液比值与绿豆清蛋白提取率关系图

Figure 3 Relationship between ratio of material to liquid and extraction rate of mung bean albumin

2.3.2 提取温度的影响 由图 4 可知, 温度为 30 ~ 40  $^{\circ}$ C 时, 提取率逐渐升高, 可能是温度升高, 蛋白质链展开, 蛋白质逐渐被溶解; 温度高于 40  $^{\circ}$ C 时, 提取率随温度升高而逐渐降低, 可能是清蛋白对高温较敏感, 当温度升至某值时蛋白质的结构被破坏导致蛋白质不能溶出<sup>[17]</sup>。同上选用 35, 40, 45  $^{\circ}$ C。

2.3.3 提取时间的影响 由图 5 可知, 提取时间为 1.0 ~ 2.5 h 时, 提取率随时间变化而变高; 当提取时间超过 2.5 h 后, 提取率逐渐下降, 可能是绿豆粉中水溶性清蛋白已经大部分溶出, 但因提取时间较长而使得之前被溶

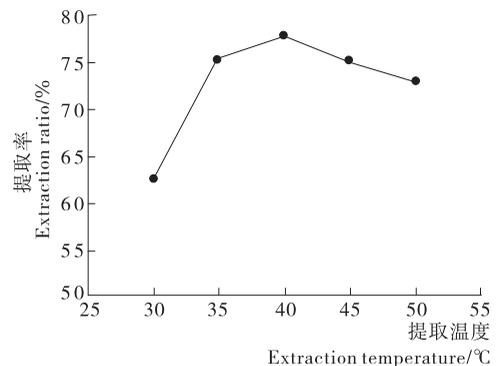


图 4 提取温度与绿豆清蛋白提取率关系图

Figure 4 Relationship between extraction temperature and mung bean albumin extraction rate

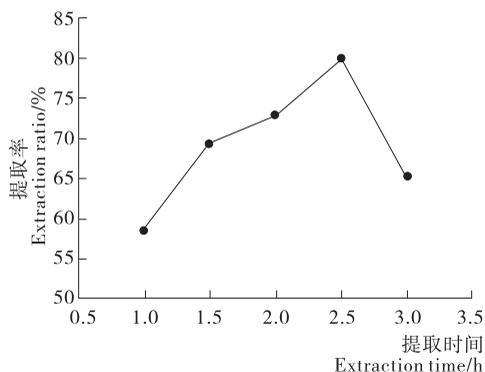


图 5 提取时间与绿豆清蛋白提取率关系图

Figure 5 Relationship between extraction time and mung bean albumin extraction rate

解出来的蛋白质发生氧化所致<sup>[18]</sup>。故选取 1.5, 2.0, 2.5 h 进行正交试验。

2.3.4 正交试验优化 正交试验因素水平取值见表 1, 试验结果见表 2。

由表 2 可知, 对绿豆清蛋白提取率的影响程度为: 提取温度 > 料液比 > 提取时间; 最佳提取组合为料液比 1 : 10 (g/mL)、提取温度 45 °C、提取时间 150 min。由正交试验得出的最优方案, 进行验证性实验 (重复 3 次), 最终

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Orthogonal experimental factor level table

水平	A 料液比 (g/mL)	B 温度/ °C	C 时间/ min
1	1 : 8	35	90
2	1 : 10	40	120
3	1 : 12	45	150

表 2 正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results

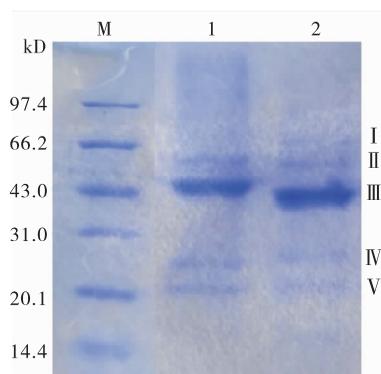
试验号	A	B	C	提取率/%
1	1	1	1	67.48
2	1	2	2	68.40
3	1	3	3	80.68
4	2	1	2	75.37
5	2	2	3	79.86
6	2	3	1	82.03
7	3	1	3	64.05
8	3	2	1	65.61
9	3	3	2	80.20
<hr/>				
$k_1$	72.19	68.97	71.71	
$k_2$	79.06	71.29	74.66	
$k_3$	69.95	80.97	74.86	
R	6.90	9.68	3.16	

提取率为 (86.79 ± 0.31)%。同比与其他杂豆中清蛋白的提取率如: 李秋杰等<sup>[19]</sup>的大豆清蛋白提取率 (66.41%)、陈晓萌<sup>[20]</sup>的红芸豆清蛋白提取率 (66.81%)、訾艳等<sup>[21]</sup>的白芸豆清蛋白提取率 (37.93%), 试验对绿豆清蛋白的提取率显著高于其他杂豆。同种原料相比结果略高于李永武<sup>[13]</sup>对绿豆清蛋白的提取率 (86.71%), 尽管优化后提取率的增长幅度不高, 但一定程度上缩短了提取时间, 减少了能源的浪费, 说明试验工艺优化效果较好。

采用凯氏定氮法对提取出的绿豆清蛋白进行蛋白纯度的测定, 3 个平行样的蛋白纯度分别为 85%, 89%, 91%, 平均值为 88.33%。

### 2.4 SPS-PAGE 电泳分析

由图 6 可知, 绿豆清蛋白主要由 4 条亚基条带组成 (II ~ V), 分子量分别为 56.2, 46.8, 26.3, 21.9 kD, 第 III 条带的颜色较浓, 表明绿豆清蛋白混合体中主要蛋白的分子量集中在 46.8 kD 左右, 与赵天瑶等<sup>[22]</sup>对绿豆清蛋白的研究结果一致。总蛋白的条带有 5 条亚基条带 (I ~ V), 分子量分别为 67.6, 54.9, 43.7, 33.9, 22.9 kD, 清蛋白的 IV、V 亚基条带分子量略小于总蛋白的亚基条带。李永武<sup>[13]</sup>对绿豆清蛋白研究发现有 6 条亚基条带, 曾志红等<sup>[23]</sup>对不同品种的绿豆进行研究, 发现大多数绿豆的总蛋白的亚基条带及其分子量与试验结果一致, 但河南毛绿豆的总蛋白具有 6 条亚基条带, 多了一条分子质量为 39.5 kD 的亚基条带。因此不同品种绿豆的清蛋白和总蛋白亚基之间存在差异。



M. 蛋白 Marker 1. 绿豆清蛋白 2. 绿豆总蛋白

图 6 绿豆蛋白的 SDS-PAGE 图

Figure 6 SDS-PAGE of mung bean protein

### 3 结论

试验对 Osborne 分级法提取绿豆清蛋白的工艺进行了优化, 得出绿豆清蛋白的最佳提取工艺为: 料液比 1 : 10 (g/mL)、提取温度 45 °C、水浴提取时间 2.5 h, 该条件下绿豆清蛋白的提取率为 (86.79 ± 0.31)%, 纯度为 88.33%。经 SDS-PAGE 电泳分析发现, 清蛋白具有 4 条亚基条带, 分子量分别为 56.2, 46.8, 26.3, 21.9 kD。

试验仅探究了料液比、提取时间和提取温度 3 个基础因素对绿豆清蛋白提取及亚基组成的影响,后续研究将进一步探讨辅助提取因素对提取率及清蛋白结构的影响。

### 参考文献

- [1] 柴岩, 冯佰利. 中国小杂粮产业发展现状及对策[J]. 干旱地区农业研究, 2003(3): 145-151.
- [2] 韩昕儒, 宋莉莉. 我国绿豆、小豆生产特征及产业发展趋势[J/OL]. 中国农业科技导报. (2019-07-19)[2019-07-25]. <https://doi.org/10.13304/j.nykjdb.2018.717>.
- [3] 曾志红, 王强, 林伟静, 等. 绿豆蛋白营养及功能特性分析[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(6): 51-55.
- [4] 林丽婷, 许秀颖, 林楠, 等. 绿豆粉营养成分测定及加工特性研究[J]. 食品工业, 2017, 38(3): 272-275.
- [5] 迟治平, 李朝阳, 刁静静, 等. 不同酸碱体系中绿豆蛋白功能及构象[J]. 中国食品添加剂, 2018(7): 78-83.
- [6] 梁丽琴, 袁道强. 绿豆分离蛋白功能特性研究[J]. 郑州轻工业学院学报, 2005(1): 50-55.
- [7] 聂丽洁. 杂豆粉及杂豆蛋白的功能性质研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2013: 23-30.
- [8] 王金水, 张长付, 郭录峰, 等. 绿豆分离蛋白功能特性研究[J]. 中国粮油学报, 1998(2): 38-41.
- [9] THOMPSON L U. Preparation evaluation mungbean protein isolates[J]. Journal of Food Science, 2014(42): 202-206.
- [10] 赵天瑶, 张亚宏, 常暖迎, 等. 绿豆萌发过程中绿豆蛋白的功能特性及其抗氧化性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 69-75.
- [11] 张舒, 王长远, 盛亚男, 等. 不同加工方式对绿豆蛋白亚基和功能性质的影响[J/OL]. 食品科学. (2019-05-20)[2019-07-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190517.1612.038.html>.
- [12] 乔宁, 张坤生, 任云霞. 绿豆中四种蛋白质的分级提取与功能性质研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 83-87.
- [13] 李永武. 绿豆清蛋白的提取及其功能特性和理化性质研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2014.
- [14] 贺建华, 邵纯君, 鹿麟, 等. 福林酚法测定甘露聚糖肽口服溶液中蛋白质的含量[J]. 中国药物评价, 2017, 34(2): 92-94.
- [15] 吕宗友, 赵国琦, 苏衍菁, 等. 白三叶叶蛋白提取及纯化工艺[J]. 草业科学, 2011, 28(11): 2 052-2 056.
- [16] 田旭静. 藜麦糠清蛋白的提取及多肽抗氧化性研究[D]. 太原: 山西大学, 2018: 12-13.
- [17] 全越, 王长远. Osborne 分级法提取燕麦麸球蛋白的响应面分析[J]. 粮食加工, 2015, 40(5): 34-38.
- [18] 肖卫华, 韩鲁佳, 杨增玲, 等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(5): 52-56.
- [19] 李秋杰, 李军生, 董文秀, 等. 大豆球蛋白和清蛋白水法提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(7): 31-37.
- [20] 陈晓萌. 红芸豆清蛋白的提取及功能性研究[D]. 太原: 山西大学, 2015: 12.
- [21] 菅艳, 王常青, 陈晓萌, 等. 白芸豆清蛋白提取工艺及分子组成研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(15): 121-123, 129.
- [22] 赵天瑶, 张亚宏, 金涛, 等. 绿豆萌发过程中蛋白组分及亚基变化[J]. 中国农业科学, 2018, 51(9): 1 783-1 794.
- [23] 曾志红, 王强, 林伟静, 等. 绿豆蛋白营养及功能特性分析[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(6): 51-55.
- [6] 臧明伍, 王守伟, 乔晓玲, 等. 肉制品磷酸盐含量调查与限量研究[J]. 肉类研究, 2012(7): 16-20.
- [7] 南庆贤. 肉类工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 201-203.
- [8] 殷鲲鹏. 提高冷却肉保水性的工艺优化研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012: 3.
- [9] 杜燕. 宰前因素对牛肉品质影响的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009: 14.
- [10] 金海莉, 王海丽, 梁成云, 等. 葡萄柚籽提取物对延边黄牛肉保鲜效果的影响[J]. 肉类研究, 2013, 27(6): 29-32.
- [11] NEATH K E, DEL BARRIO A N, LAPITAN R M, et al. Difference in tenderness and pH decline between water buffalo meat and beef during postmortem aging[J]. Meat Science, 2007, 75(3): 499-505.
- [12] 赵婉竹, 高毅刚, 王增凯, 等. 富硒酵母对延边黄牛贮藏品质影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(9): 136-140.
- [13] 袁璐. 高氧气调包装对冷却肉贮藏期间保水性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 24.
- [14] 余小领, 李学斌, 陈会. 猪肉色泽和保水性的相关性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 44-46.
- [15] 刘宗敏, 江红波, 王鹏, 等. 磷酸盐在肉制品中应用研究现状及发展趋势[J]. 肉类研究, 2010(6): 50-52.
- [16] 赵改名, 王艳玲, 田玮. 影响牛肉嫩度的因素及其机制[J]. 国外畜牧科技, 2000(2): 35-40.
- [17] 王晓华, 曹恺, 甘泉, 等. 肉品的嫩化机制、方法及其影响因素[J]. 中国农学通报, 2008(9): 94-98.
- [18] FERGUSON D M, BRUCE H L, THOMPSON J M, et al. Factors affecting Beef palatability-farmgate to chilled carcass[J]. Journal of Experimental Agriculture, 2001, 41: 879-891.
- [19] 黄明. 牛肉成熟机制及食用品质研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2003: 79.
- [20] FONSECA B, KURI V, ZUMALACARREGUI J M, et al. Effect of the use of a commercial phosphate mixture on selected quality characteristics of 2 Spanish-style dry-ripened sausages[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(5): 300-305.
- [21] 甄少波. 待宰对猪应激及冷却肉品质影响机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2013: 5.
- [22] 吴菊清, 李春保, 周光宏, 等. 宰后成熟过程中冷却牛肉、肉色泽和嫩度的变化[J]. 食品科学, 2008(10): 136-139.
- [23] 侯旭. 吊挂方式和成熟时间对牛肉品质的影响及机理[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014: 31.
- [24] 乔晓玲, 张迎阳. 肉类工业面临的磷酸盐问题[J]. 肉类研究, 2004(4): 36-38.

(上接第 96 页)