

杨万君,周轶亭,周光宏,等. 贮藏时间对酱排骨蛋白质体外消化率和风味的影响[J].江苏农业学报,2017,33(6):1386-1394.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.027

## 贮藏时间对酱排骨蛋白质体外消化率和风味的影响

杨万君, 周轶亭, 周光宏, 徐幸莲, 李春保

(南京农业大学肉品加工与质量控制教育部重点实验室/农业部肉品加工重点实验室/江苏省肉类生产与加工质量安全控制协同创新中心,江苏 南京 210095)

**摘要:** 为探究贮藏时间对酱排骨蛋白质体外消化率及其风味的影响,通过体外模拟消化试验、SDS-PAGE 凝胶电泳、液相串联质谱和电子鼻等方法测定了贮藏 0(新鲜)、1、2、4、6 个月的酱排骨蛋白质体外消化率和风味变化。结果表明:随着贮藏时间的延长,酱排骨蛋白质体外消化率呈现下降趋势,贮藏 4 个月的胃蛋白酶消化率显著降低,贮藏 2 个月的胃蛋白酶+胰蛋白酶消化率显著下降。贮藏过程中活性巯基含量下降,全蛋白质光密度值增加。不同贮藏时间(新鲜和贮藏 1、2、4、6 个月)酱排骨蛋白质体外酶解产物肽段序列存在显著差异,胃蛋白酶消化产物中特有肽段数量分别为 18、20、19、15、35,胃蛋白酶+胰蛋白酶消化后特有肽段数量分别为 41、39、19、30、45。贮藏过程中酱排骨风味发生显著变化,新鲜和贮藏 1 个月的风味相似。

**关键词:** 酱排骨;蛋白质;体外消化;风味

**中图分类号:** TS251.6<sup>+</sup>1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2017)06-1386-09

## Effects of storage time on *in vitro* digestion of protein and volatile flavor in sauced ribs

YANG Wan-jun, ZHOU Yi-ting, ZHOU Guang-hong, XU Xing-lian, LI Chun-bao

(Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education/Key Laboratory of Animal Products Processing, Ministry of Agriculture/Jiangsu Collaborative Innovative Center of Meat Production, Processing and Quality Control, Jiangsu Province, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In order to explore the effect of storage time on *in vitro* protein digestion and flavor components of sauced ribs, *in vitro* simulated digestion, SDS-PAGE, LC-MS-MS and electronic nose analysis were applied to determine the protein digestibility and flavor compounds of sauced ribs stored for 0 (fresh), 1, 2, 4 and 6 months. The results showed that the digestibility of the sauced ribs decreased along with the storage time. The pepsin digestibility decreased significantly after four-month storage, while the trypsin digestibility decreased significantly after storage for two months. The content of active thiol group declined and the total protein density increased during the storage. The number of peptides in the pepsin-digested samples stored for 0, 1, 2, 4 and 6 months was 18, 20, 19, 15 and 35, respectively, while the number of peptides in the trypsin-digested samples was 41, 39, 19, 30 and 45. The flavor substances changed greatly during storage, but the

flavor substances of fresh products were similar to those stored for one month.

**Key words:** sauced ribs; protein; *in vitro* digestibility; volatile flavor

收稿日期:2017-05-30

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0400100);江苏省自主创新基金项目[CX(15)1006];国家生猪产业体系项目(CARS-36-11);江苏省优势学科食品科学与工程

作者简介:杨万君(1990-),女,山东泰安人,硕士,研究方向为肉品加工与质量控制。(E-mail)2217315757@qq.com

通讯作者:李春保,(E-mail)chunbao.li@njau.edu.cn

酱排骨是中国一类传统肉制品,历史悠久,闻名中外,其色泽酱红、肉质酥烂、汁味浓鲜,深受广大消

费者的喜爱<sup>[1]</sup>。真空包装是目前酱卤肉制品的主要包装方式,杀菌后可以在常温下贮藏9~12个月。货架期对肉制品品质、外观和消费者的可接受度具有一定的影响<sup>[2]</sup>。氧化是肉制品在贮藏和加工过程中品质恶化的主要原因之一<sup>[3]</sup>。肉制品氧化可以分为脂质氧化和蛋白质氧化。蛋白质氧化可以造成蛋白质部分功能特性丧失,降低其生物利用率和营养价值<sup>[4]</sup>。氧化蛋白质对人体内的消化、吸收及代谢有一定影响,温和的氧化可诱导蛋白质轻微修饰和结构局部折叠,从而增加对蛋白酶敏感性<sup>[5]</sup>,而高氧化环境可使蛋白质交联,甚至大量聚集和蛋白酶活性部位被修饰<sup>[6]</sup>,导致蛋白质水解率及其对肠道蛋白酶的敏感性降低<sup>[7]</sup>,此外也会影响肉品风味<sup>[8]</sup>。

随着生活水平的日益提高,消费者越来越注重产品的营养价值和风味品质。目前有关酱卤肉制品贮藏时间对蛋白质体外消化的研究尚未见报道。本研究从蛋白质体外消化率、消化粒径、消化产物及挥发性风味物质变化等方面,揭示贮藏时间对酱排骨蛋白质体外消化率和风味的影响,为酱排骨加工与合理消费提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料、仪器与试剂

酱排骨选用真空包装三凤桥酱排骨(从无锡三凤桥食品有限公司采样)。胃蛋白酶,提取自猪胃黏膜,酶活性 $\geq 400$  U/mg,购于美国Sigma Aldrich公司;胰蛋白酶,提取自猪胰脏,酶活力 $\geq 1\,645$  U/mg,购于美国Sigma Aldrich公司;Ultracel-3超滤管,每管处理量0.5 ml,截留分子量 $\geq 3\times 10^3$ ,购于美国Millipore公司;ZipTip C18 pipette tips,购于美国Millipore公司;BCA蛋白质定量试剂盒,购于美国Thermo Scientific公司;Bio-Rad 4%~12% Bis-Tris Criterion 标准预制胶、蛋白质电泳标准品,购于美国Bio-Rad。T25匀浆机,德国IKA公司产品;Allegra 64R台式高速冷冻离心机,美国Beckman Coulter公司产品;M2多功能酶标仪,美国Molecular Devices公司产品;Fiveeasy台式pH计,瑞士Mettler Toledo公司产品;LCG冷冻干燥机,德国Christ公司产品;中型垂直电泳系统,美国Bio-Rad公司产品;ImageScanner III成像仪,美国GE Health Care公司产品;马尔文3000激光粒度仪,英国Malvern公司产品;TW20水浴锅,德国Julabo公司产品;Nano LC-LTQ-Or-

bitrap XL MS/MS纳升级液相串联质谱仪器,美国Thermo Fisher公司产品;FOX4000电子鼻,法国Alpha MOS公司产品。

### 1.2 试验方法

1.2.1 体外模拟消化试验 参照Li等<sup>[9]</sup>的方法稍作修改。首先称取1.0 g样品,加入4 ml PBS(10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , pH7.0),在冰浴条件下,9 500 r/min、30 s匀浆2次,13 400 r/min、30 s匀浆2次,每次匀浆之间间隔30 s。为了模拟胃里的酸性环境,使用1 mol/L HCl溶液将匀浆后的样品pH调至 $2.0\pm 0.1$ 。配制浓度为0.032 g/ml的胃蛋白酶预混液,在每份样品中加入1.0 ml胃蛋白酶预混液并充分混匀。加入胃蛋白酶的样品在37℃的条件下匀速摇晃反应2 h。反应完毕后,用1 mol/L NaOH将混合液pH迅速调至7.0左右以终止胃蛋白酶酶解反应。调整pH为 $7.5\pm 0.1$ ,取出1 ml混合液即为胃蛋白酶酶解产物。在胃蛋白酶酶解产物中,加入1.0 ml 0.024 g/ml胰蛋白酶预混液,模拟肠道消化酶体系,并在37℃下匀速摇晃反应2 h。反应完成后,对样品进行5 min沸水浴,终止蛋白酶反应。取出4 ml混合液,即为胃蛋白酶和胰蛋白酶两步水解产物。在胃蛋白酶水解产物和两步水解产物中分别加入12 ml无水乙醇,在4℃条件下静置12 h。之后在4℃条件下10 000 g离心20 min。将上清液和沉淀贮藏在-18℃条件下,用于下一步试验。

1.2.2 蛋白质消化率的测定 参照Li等<sup>[9]</sup>的方法稍作修改。从新鲜和贮藏1、2、4、6个月的酱排骨样品中分别称取2份3.0 g绞碎肉样。一份仅加入胃蛋白酶进行消化,另一份依次加入胃蛋白酶和胰蛋白酶进行两步消化,消化过程按照方法1.2.1。消化后的混合液加入36 ml无水乙醇,在4℃条件下静置12 h后离心(10 000 g,20 min,4℃)。分离后的沉淀在50℃条件下烘干至恒质量,并记录质量。称取0.05 g烘干的沉淀,加入2 ml SDS溶液(2% SDS, 10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , pH7.0),充分混匀后离心(4 000 g,5 min,4℃)。上清液用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。计算消化率(DT):  $DT = [(W_0 - W_1)/W_0] \times 100\%$ ,式中 $W_1$ 为消化后烘干沉淀物中蛋白质含量(g), $W_0$ 为消化前样品中蛋白质含量(g)。

1.2.3 SDS-PAGE电泳 参照Li等<sup>[10]</sup>的方法稍作修改。1.0 g样品加入15 ml全蛋白质提取液(5%

SDS, 0.01 mol/L PBS, pH 7.0), 在冰浴下匀浆。匀浆混合液在 1 500 g、4 ℃ 下离心 15 min, 取上清液备用。用 BCA 试剂盒测定蛋白质混合液的蛋白质浓度。取适量蛋白质混合液与样品缓冲液混匀, 制成蛋白质浓度为 1.5 μg/μl 的电泳上样液, 电泳上样液 95 ℃ 水浴加热 5 min。采用 4%~12% Bis-Tris 标准预制胶, 每条泳道上样 12 μl, 每个样品平行上样 2 次以减少误差。在 120 V 条件下电泳 1.5 h, 直至条带前端的溴酚蓝消失。电泳结束后, 使用考马斯亮蓝 R250 染色 30 min, 用脱色液脱色至条带清晰, 背景无颜色。用成像仪 (GE Healthcare) 对凝胶进行扫描并保存图像, 然后用 Quantity One (Bio-Rad) 软件对捕获到的条带进行分析。通过将实际检测出的光密度与校准 Marker 中分子量  $1.90 \times 10^5$  条带光密度相除得到捕获条带的光密度。

1.2.4 消化产物中多肽序列的鉴定 运用纳升级液相串联质谱仪鉴定胃蛋白酶酶解及胃蛋白酶和胰蛋白酶两步酶解的消化产物, 鉴定参考 Wen 等的方法<sup>[11]</sup>。

1.2.5 蛋白质活性巯基含量的测定 参照 Ellman<sup>[12]</sup> 等方法, 使用 5,5'-二硫代二硝基苯甲酸盐 (DNTB) 滴定法测定样品蛋白质溶液中活性巯基的含量。取 1 g 样品加入 4 ml 5% SDS 蛋白质提取液 (5% SDS, 0.1 mmol/L PBS, pH=7.0) 按照方法 1.2.1 中的匀浆过程, 充分混合后离心 (6 000 g, 10 min, 4 ℃)。上清液用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 加入适量蛋白质提取液将蛋白质浓度稀释到 5 mg/ml 左右。取 100 μl 蛋白质溶液加入 1 ml TGE 缓冲液 (10.4 g/L Tris, 6.9 g/L 甘氨酸, 1.2 g/L EDTA, pH 8.0) 及 0.02 ml DNTB (4 g DNTB, 10.4 g/L Tris, 6.9 g/L 甘氨酸, 1.2 g/L EDTA, pH 8.0)。充分混匀后在 25 ℃ 水浴条件下孵育 60 min。96 孔酶标板每孔加入 200 μl 待测样品, 以未加 DNTB 的缓冲液作为空白对照, 在 412 nm 下读数。每个样品测定 3 次。巯基含量 =  $73.53 \times A_{412} \times D/\rho$ , 式中  $A_{412}$  为 412 nm 下的吸光值,  $\rho$  为样品蛋白质浓度 (g/ml),  $D$  为稀释系数 (11.2)。

1.2.6 消化粒径的测定 取方法 1.2.1 匀浆后蛋白质混合液、胃蛋白酶酶解后的混合液以及胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解后的混合液, 使用马尔文激光粒度仪 3000 测定粒度大小<sup>[13]</sup>。

1.2.7 酱排骨风味测定 采用 FOX-4000 电子鼻

(表 1) 进行测定。称取 1 g 样品, 放入 10 ml 的电子鼻专用顶空瓶, 封好盖子。电子鼻检测器校准后, 将处理好的样品按顺序放入电子鼻样品托盘中进行检测。顶空参数: 顶空注射体积 500 μl, 注射速度 500 μl/s, 注射总体积 2.5 ml, 采集时间 120 s, 进样量 1 000 μl, 顶空加热温度 70 ℃, 顶空加热时间 200 s, 延滞采集时间 600 s, 数据采集时间 120 s, 采集周期 1.0 s, 载气为高纯空气, 流速 150 ml/min。

表 1 FOX-4000 电子鼻所用传感器及其性能描述

Table 1 Sensors for the FOX-4000 electronic nose and its performance description

序号	传感器名称	敏感物质类型
1	LY2/LG	氯、氟、氮氧化合物、硫化物
2	LY2/G	氨、胺类化合物、碳氧化合物
3	LY2/AA	乙醇、丙酮、氨
4	LY2/GH	氨、胺类化合物
5	LY2/gCTI	硫化氢
6	LY2/gCT	丙烷、丁烷
7	T30/1	极性化合物、氯化氢
8	P10/1	非极性、碳氢化合物、氨、氯
9	P10/2	非极性、甲烷、乙烷
10	P40/1	氟、氯
11	T70/2	甲苯、二甲苯、一氧化碳
12	PA/2	乙醇、氨水、胺类化合物
13	P30/1	碳氢化合物、氨、乙醇
14	P40/2	氯、硫化氢、氟化物
15	P30/2	硫化氢、酮
16	T40/2	氯
17	T40/1	氟
18	TA/2	乙醇

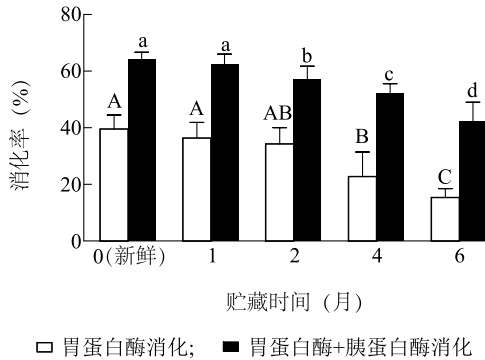
1.2.8 数据统计分析 数据采用 SAS (SAS Institute, 版本 9.1.2) 进行单因素方差分析, 并用 Duncan's s 法比较处理组间的差异。采用 EZinfo (Umetrics, 版本 3.0.3.0) 对电子鼻数据进行 PLS-DA 多元统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 贮藏时间对酱排骨蛋白质体外消化率的影响

酱排骨蛋白质体外消化率随着贮藏时间的增长而呈现下降的趋势 (图 1)。在不同贮藏时间酱排骨体外胃蛋白酶模拟消化试验中, 新鲜酱排骨的蛋白质消化率最高, 贮藏 6 个月的消化率最低, 新鲜、贮

贮藏1个月、贮藏2个月的酱排骨蛋白质体外消化率无显著差异( $P>0.05$ ),从贮藏4个月开始蛋白质消化率显著下降( $P<0.05$ )。而在胃蛋白酶和胰蛋白酶模拟消化试验中,新鲜酱排骨的消化率最高,贮藏1个月的酱排骨与新鲜酱排骨之间消化率不存在显著差异( $P>0.05$ ),贮藏2个月的显著下降( $P<0.05$ ),贮藏6个月的酱排骨蛋白质消化率最低。



不同大写字母表示胃蛋白酶消化率差异显著,不同小写字母表示胃蛋白酶和胰蛋白酶消化率差异显著。

图1 贮藏时间对酱排骨蛋白质体外消化率的影响

Fig.1 Effects of storage time on the *in vitro* digestion of protein in sauced ribs

表2 不同贮藏时间酱排骨体外消化粒径的变化

Table 2 Changes of *in vitro* digestion particle size of sauced ribs stored for different time

体外消化过程	贮藏时间(月)	$D_{3,2}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{4,3}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{x(10)}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{x(50)}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{x(90)}$ ( $\mu\text{m}$ )
匀浆	0(新鲜)	32.9±5.4c	117.6±14.2c	12.9±3.5c	101.3±11.5c	229.7±25.5c
	1	35.3±3.7c	149.5±26.4b	14.2±2.7c	114.6±13.4b	325.6±80.5b
	2	42.6±3.7b	189.0±20.7a	27.0±10.9b	130.0±9.0a	443.1±62.7a
	4	44.0±6.7b	158.0±7.8b	29.6±14.8ab	125.8±4.8a	323.5±37.3b
	6	51.5±6.1a	165.7±9.5b	40.7±15.4a	133.5±8.7a	332.3±18.5b
胃蛋白酶消化	0(新鲜)	27.8±3.2ab	87.1±9.9abc	9.5±1.2a	78.3±7.7bc	172.5±16.7ab
	1	28.3±2.1ab	92.5±11.1ab	9.6±1.0a	84.4±9.4ab	180.6±20.5ab
	2	30.3±2.1a	99.7±9.1a	10.1±0.8a	88.3±6.0a	196.6±18.3a
	4	21.1±0.9c	78.3±6.8c	6.7±0.1b	71.6±7.6c	161.6±9.9b
	6	26.1±2.8b	83.9±21.1bc	9.2±1.2a	74.3±11.9c	169.1±49.3ab
胃蛋白酶+胰蛋白酶消化	0(新鲜)	24.5±2.1b	68.5±5.2c	8.5±0.7b	64.2±5.2b	135.5±8.1b
	1	24.9±2.0b	74.2±5.5ab	8.7±0.9b	71.2±6.2a	141.1±8.9ab
	2	27.8±3.1a	75.7±4.4a	9.7±1.4a	70.5±4.2a	147.7±8.7a
	4	21.8±1.7c	69.3±5.2bc	7.5±0.7c	66.8±5.7ab	134.1±7.1b
	6	20.9±1.1c	51.3±4.6d	7.8±0.3bc	48.2±5.6c	101.2±6.9c

同列不同字母表示粒径大小差异显著( $P<0.05$ )。 $D_{4,3}$ 表示体积质量等效平均直径,即粒径对体积的加权平均值; $D_{3,2}$ 表示体积表面积等效平均值,即粒径对表面积的加权平均值; $D_{x(10)}$ 、 $D_{x(50)}$ 、 $D_{x(90)}$ 分别表示粒径积累值达到体积百分比的10%、50%、90%时的粒径大小。

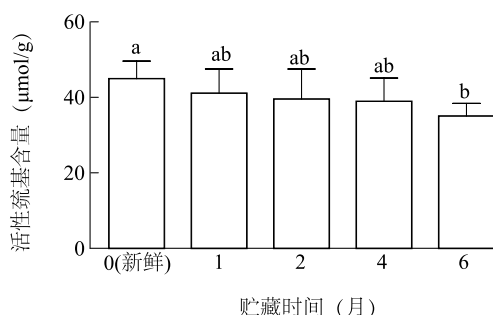
## 2.2 贮藏时间对酱排骨蛋白质体外消化粒径的影响

由表2可知,随着贮藏时间的延长,匀浆后粒径 $D_{3,2}$ 和 $D_{x(10)}$ 显著增大( $P<0.05$ ),新鲜、1个月、2个月处理组中 $D_{4,3}$ 和 $D_{x(90)}$ 随贮藏时间增加而显著增大( $P<0.05$ ),在4个月、6个月处理组中呈降低趋势,新鲜组的粒径值最小。经胃蛋白酶消化后,新鲜、1个月、2个月处理组的 $D_{4,3}$ 、 $D_{3,2}$ 、 $D_{x(10)}$ 、 $D_{x(50)}$ 、 $D_{x(90)}$ 随贮藏时间延长有增加的趋势,但差异不显著( $P>0.05$ ),贮藏至4个月粒径显著降低( $P<0.05$ )。经过胃蛋白酶和胰蛋白酶两步消化之后,粒径变化趋势与经过胃蛋白酶消化后的趋势一致。

## 2.3 贮藏时间对酱排骨蛋白质活性巯基含量的影响

酱排骨中蛋白质活性巯基含量随贮藏时间的延长总体呈现下降的趋势(图2)。新鲜组和贮藏1个月、2个月、4个月组蛋白质的活性巯基含量无显著差异( $P>0.05$ ),贮藏至6个月时,蛋白巯基含量与新鲜组相比显著下降( $P<0.05$ )。活性巯基含量的减少主要是由于二硫键的形成,即蛋白质中活性巯基的氧化和相关共价化合物的产生。





不同小写字母表示差异达到 0.05 显著水平。

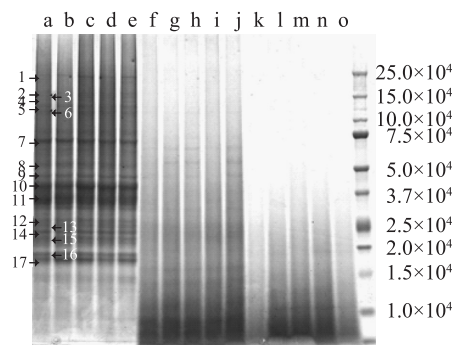
图 2 贮藏时间对酱排骨蛋白质活性巯基含量的影响

Fig.2 Effects storage time on the content of free sulfhydryl groups of sauced ribs protein

## 2.4 不同贮藏时间酱排骨蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱的变化

SDS-PAGE 电泳结果显示不同贮藏时间酱排骨蛋白质含量存在较大差异(图 3)。图 3 中条带 1、2、3、4、5、7、9、10、13、15 相对光密度值存在显著差异( $P < 0.05$ ),尤其是贮藏 6 个月组的条带相对光密度值显著增大(表 3)。在未消化样品的泳道上有明显的拖带现象,这主要是由于在加工过程中,肉蛋白经过长时间煮制而发生聚集和降解而形成的。电泳图中条带的变化表明,经胃蛋白酶降解后,不同贮藏时间酱排骨的大分子蛋白质都降解成较小的片段,在

分子量  $2 \times 10^3 \sim 15 \times 10^3$  范围内出现了较多的蛋白质碎片。而再进一步经过胰蛋白酶酶解后,在泳道内基本观察不到明显条带,可以认为蛋白质被降解成小分子的多肽和氨基酸。电泳结果还表明,随着贮藏时间的延长,大分子蛋白质含量越多,越不容易被胃蛋白酶和胰蛋白酶水解,这与随着贮藏时间的延长消化率逐渐降低的结果相吻合。



a~e: 消化前,依次为新鲜、贮藏 1 个月、贮藏 2 个月、贮藏 4 个月、贮藏 6 个月;f~j: 胃蛋白酶消化后,依次为新鲜、贮藏 1 个月、贮藏 2 个月、贮藏 4 个月、贮藏 6 个月;k~o: 胃蛋白酶和胰蛋白酶消化后,依次为新鲜、贮藏 1 个月、贮藏 2 个月、贮藏 4 个月、贮藏 6 个月。

图 3 不同贮藏时间酱排骨中蛋白质消化前后 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE profiles of proteins from sauced ribs stored for different times before and after digestion

表 3 不同贮藏时间酱排骨蛋白质 SDS-PAGE 相对光密度值

Table 3 Relative light density values of protein on SDS-PAGE gels from sauced ribs at different storage time

条带	相对光密度值				
	新鲜	贮藏 1 个月	贮藏 2 个月	贮藏 4 个月	贮藏 6 个月
1	0.055±0.017b	0.053±0.006b	0.056±0.022b	0.060±0.040b	0.097±0.046a
2	0.023±0.010b	0.027±0.006b	0.024±0.003b	0.024±0.007b	0.035±0.011a
3	0.030±0.009b	0.030±0.009b	0.027±0.007b	0.026±0.009b	0.044±0.020a
4	0.019±0.007ab	0.015±0.007ab	0.016±0.009ab	0.010±0.004b	0.023±0.009a
5	0.022±0.009b	0.024±0.011b	0.027±0.006ab	0.030±0.002ab	0.039±0.022a
6	0.033±0.005a	0.031±0.007a	0.033±0.008a	0.038±0.003a	0.041±0.021a
7	0.182±0.085ab	0.165±0.021b	0.096±0.028c	0.237±0.041a	0.221±0.032a
8	0.073±0.038a	0.083±0.015a	0.077±0.024a	0.086±0.040a	0.100±0.036a
9	0.302±0.101cb	0.456±0.134a	0.401±0.135abc	0.429±0.138ab	0.287±0.118c
10	0.268±0.153b	0.279±0.133b	0.281±0.134b	0.397±0.161ab	0.503±0.119a
11	0.033±0.008a	0.035±0.012a	0.037±0.017a	0.035±0.011a	0.041±0.013a
12	0.039±0.013a	0.043±0.015a	0.044±0.014a	0.040±0.011a	0.029±0.012a
13	0.057±0.045b	0.086±0.038ab	0.072±0.031ab	0.103±0.037a	0.078±0.018ab
14	0.048±0.030a	0.071±0.041a	0.058±0.035a	0.094±0.073a	0.045±0.029a
15	0.090±0.020b	0.236±0.109a	0.177±0.116ab	0.143±0.063ab	0.167±0.083ab
16	0.392±0.068a	0.449±0.124a	0.441±0.139a	0.477±0.059a	0.433±0.124a
17	0.928±0.174a	1.045±0.211a	1.001±0.272a	0.972±0.215a	1.040±0.340a

同一行中不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.5 不同贮藏时间酱排骨蛋白质体外酶解产物肽段序列差异

将酱排骨蛋白质体外酶解产物肽段序列进行韦恩交集分析,结果如图4所示。从新鲜、贮藏1个月、2个月、4个月、6个月的酱排骨胃蛋白酶消化产物中鉴定到共有的肽段数量为71,特有的肽段数量

分别为18、20、19、15、35;在胃蛋白酶和胰蛋白酶消化产物中鉴定到共有的肽段数量为211,特有的肽段数量分别为41、39、19、30、45。不同贮藏时间酱排骨蛋白质体外酶解产物肽段序列数量和种类存在显著差异。

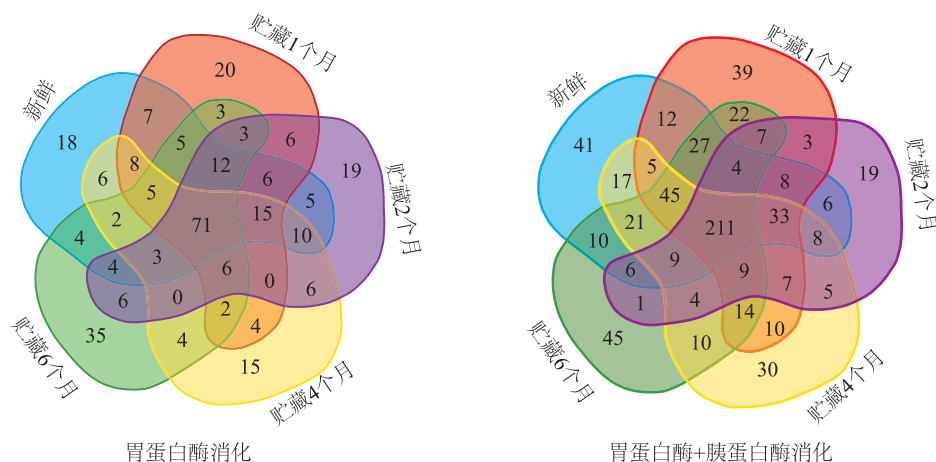


图4 不同贮藏时间酱排骨蛋白质消化产物肽段差异

Fig.4 Venn diagrams of peptides obtained from sauced ribs at different storage time

## 2.6 不同贮藏时间酱排骨蛋白质体外酶解产物肽段数量分布

从新鲜、贮藏1月、2月、4月、6月酱排骨的胃蛋白酶消化产物中分别鉴定到181、166、172、157、165条肽段,在胃蛋白酶+胰蛋白酶消化产物中分别鉴定到463、433、340、438、445条肽段,新鲜酱排骨中鉴定到的肽段数量最多。

把鉴定到的肽段按分子量大小分为 $\geq 800$ 且 $<1\,000$ 、 $\geq 1\,000$ 且 $<2\,000$ 、 $2\,000\sim 3\,500$ 三组。由图5可知,经胃蛋白酶消化后,鉴定到的 $\geq 800$ 且 $<1\,000$ 组肽段数量都最少,2000~3500组肽段数量居中, $\geq 1\,000$ 且 $<2\,000$ 组肽段数量最多。在胃蛋白酶+胰蛋白酶消化产物中鉴定到的肽段数量多于胃蛋白酶消化后的肽段数量,但分子量分布没有发生变化(图6)。肽段数量显著增加说明肌原纤维蛋白和肌浆蛋白与胰蛋白酶的结合性提高了。

## 2.6 贮藏时间对酱排骨风味的影响

采用电子鼻对不同贮藏时间酱排骨的风味进行比较测定。测定结果(图7)显示,不同贮藏时间酱排骨整体风味在LY2/LG、P40/2、P30/1、T40/1、TA/2、P10/2传感器上存在显著差异,新鲜和贮藏1

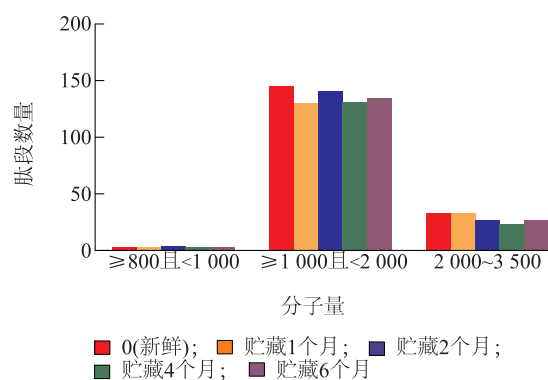


图5 不同贮藏时间酱排骨蛋白质胃蛋白酶酶解产物肽段数量分布

Fig.5 The distribution of the numbers of identified peptides from sauced ribs at different storage time with pepsin digesta categorized

个月的酱排骨传感器信号强度相似。

由图8可知,第1主成分( $t_1$ )和第2主成分( $t_2$ )的贡献率分别为90.0%和4.6%,二者之和达到94.6%,能够反映样品的整体信息。新鲜和贮藏1个月的酱排骨整体香气成分重叠,电子鼻不能将其分开,说明新鲜的和贮藏1个月的酱排骨风味接近。新

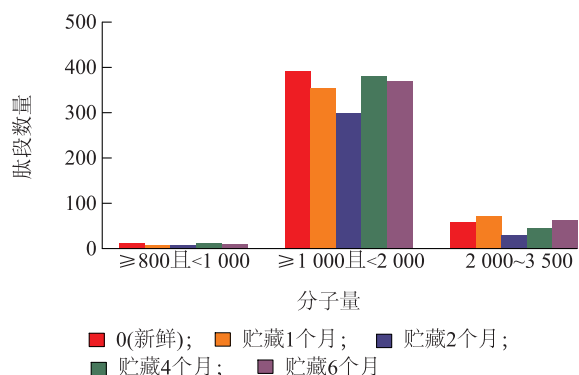
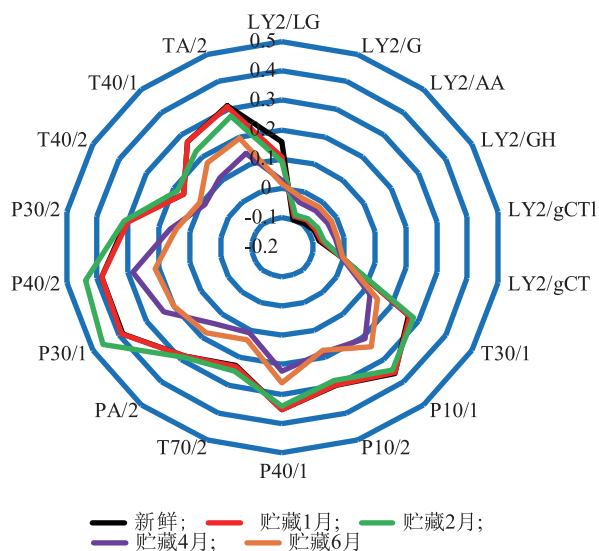


图6 不同贮藏时间酱排骨蛋白质胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解产物肽段数量分布

Fig.6 The distribution of the number of identified peptides from sauced ribs at different storage time with pepsin and trypsin digesta categorized

鲜,贮藏1个月和贮藏2个月的风味差异主要体现在  $t_2$  上,  $t_2$  的贡献率比较小,说明三者的香气差异不显著;贮藏4个月、6个月的酱排骨与其余3个时间样品距离较远,且差异主要体现在  $t_1$  上,说明香气成分存在显著差异;贮藏4个月与6个月样品差异主要体现在  $t_2$  上,说明两者的香气特征较为相似。



LY2/LG 等为电子鼻传感器名称(见表1)。

图7 不同贮藏时间酱排骨的风味物质指纹图

Fig.7 The flavor fingerprint of sauced ribs at different storage time

### 3 讨论

蛋白质消化率反映食物中蛋白质被分解和吸收

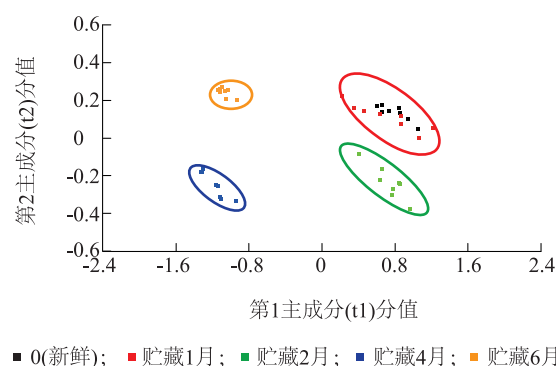


图8 不同贮藏时间的酱排骨风味物质电子鼻数据偏最小二乘判别(PLS-DA)分析

Fig.8 PLS-DA plot of electronic nose data of flavor substances in sauced ribs at different storage time

的程度,消化率越高越易被生物体吸收利用<sup>[14]</sup>。随着贮藏时间延长,酱排骨蛋白质消化率逐渐降低。Koutina 等<sup>[15]</sup>在对帕尔玛火腿的研究过程中发现,氧化所引起的蛋白质变化将影响其与消化酶的结合性。本研究中,酱排骨蛋白质的胃蛋白酶消化率在贮藏4个月时出现显著降低,胃蛋白酶和胰蛋白酶消化率在贮藏2个月时出现显著降低,胰蛋白酶酶解受贮藏时间的影响较大。酱排骨在预处理和杀菌过程中长时间高温煮制触发了蛋白质氧化,这类氧化与蛋白质高度变性释放出的铁离子和其他活性产物有关。在长期储存过程中,真空包装中剩余氧气可能与蛋白质以及肌间脂肪发生进一步的氧化反应<sup>[16-17]</sup>。巯基含量的降低说明酱排骨在贮藏过程中发生了氧化。蛋白质分子间通过二硫键交联、聚集,是巯基含量降低的主要原因之一<sup>[18-19]</sup>。本试验中酱排骨贮藏6个月时,活性巯基含量的减少主要是由于二硫键的形成,即蛋白质中活性巯基的氧化和相关共价化合物的产生。这与肉类冷藏过程中变化一致<sup>[20-22]</sup>。

酱排骨肉样匀浆粒径随贮藏时间的延长呈先增加后降低的趋势。这可能与贮藏过程中发生的蛋白质氧化和聚集有关<sup>[23]</sup>。有研究结果<sup>[24-26]</sup>表明,在宰后鲜肉储藏和肉制品加工过程中蛋白质会降解。鲜肉贮藏过程中匀浆物粒径出现下降的趋势可能与蛋白质在内源酶作用下的降解有关。而对于肉制品而言,则可能由于氧化导致蛋白质疏水性增加,蛋白质粒径变小。由不同储存时间酱排骨蛋白质消化前后的一维凝胶电泳图可以看出,不同储存时间酱排骨

蛋白质降解的程度不同。加热过程引发的蛋白质氧化在储存期内持续,造成蛋白质的聚集和交联,从而改变不同分子量条带的分布和光密度<sup>[27]</sup>。纳升级液相串联质谱仪测定结果表明不同贮藏时间酱排骨蛋白质体外酶解产物肽段序列存在显著差异。有研究者报道,氧化诱导蛋白质变化,例如氨基酸侧链的修饰,蛋白质聚合物的形成,溶解性的损失,羰基含量的增加,氨基酸组成的变化和蛋白质水解敏感性的增加<sup>[28-29]</sup>。Rutherford<sup>[30]</sup>等报道,蛋白质氧化可通过蛋白质变性和限制多肽的生成 2 种机理影响蛋白质的消化。因此,蛋白质的氧化可能会降低其在肠道的消化和吸收。随着贮藏时间的延长,酱卤肉制品中蛋白质发生氧化,使消化率降低,导致消化产物的差异。贮藏 2 个月之内,酱排骨的风味物质变化不大,贮藏 4 个月之后酱排骨风味发生了显著变化,可能与脂肪和蛋白质的氧化有关。富含不饱和脂肪的肉制品最易受脂质氧化的影响<sup>[31]</sup>。脂肪氧化能够形成影响产品风味的氧化产物,比如醛类、酮类<sup>[32]</sup>。贮藏过程中,蛋白质构象的改变会导致有效作用位点的改变从而影响其与挥发性化合物的作用<sup>[33-34]</sup>。

## 参考文献:

- [1] 杨万君,周轶亭,周光宏,等. 三种品牌酱排骨中蛋白质体外消化研究[J]. 肉类工业, 2017 (3): 17-23.
- [2] TOBOORUN V, CHANTHANAM T, URIYAPONGSON S, et al. Effect of packaging tray and shelf-life on meat quality, appearance and acceptability of consumer on pork [EB/OL]. (2005) [2017-05-27]. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TH2007000693>.
- [3] ZHANG W, XIAO S, AHN D U. Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013, 53(11):1191-1201.
- [4] HU M, JACOBSEN C. Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats [M]. Urbana, IL: AOCS Press, 2016: 373-389.
- [5] WEN S, ZHOU G, LI L, et al. Effect of cooking on in vitro digestion of pork proteins: A peptidomic perspective[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(1):250-261.
- [6] GATELLIER P, KONDOYAN A, PORTANGUEN S, et al. Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality[J]. Meat Science, 2010, 85(4):645-650.
- [7] RYSMAN T, HECKE T V, POUCKE C V, et al. Protein oxidation and proteolysis during storage and in vitro, digestion of pork and beef patties[J]. Food Chemistry, 2016, 209:177-184.
- [8] DAMODARAN S, KINSELLA J E. Flavor protein interactions. Binding of carbonyls to bovine serum albumin: thermodynamic and conformational effects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1980, 28(3):567-571.
- [9] LI L, LIU Y, ZOU X, et al. In vitro protein digestibility of pork products is affected by the method of processing[J]. Food Research International, 2017, 92:88-94.
- [10] LI C B, LI J, ZHOU G H, et al. Electrical stimulation affects metabolic enzyme phosphorylation, protease activation, and meat tenderization in beef[J]. Journal of Animal Science, 2012, 90(5):1638-1649.
- [11] WEN S, ZHOU G, SONG S, et al. Discrimination of in vitro and in vivo digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish[J]. Proteomics, 2015, 15(21):3688-3698.
- [12] ELLMAN G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1959, 82(1):70-77.
- [13] SUN W, ZHOU F, ZHAO M, et al. Physicochemical changes of myofibrillar proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and in vitro digestibility[J]. Food Chemistry, 2011, 129(2):472-478.
- [14] 袁磊,唐瑜,刘晓庚. 蛋白质消化率的影响因素研究[J]. 粮食科技与经济, 2015, 40(3):43-46.
- [15] KOUTINA G, JONGBERG S, SKIBSTED L H. Protein and lipid oxidation in Parma ham during production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(38):9737-9745.
- [16] HES M. Protein-lipid interactions in different meat systems in the presence of natural antioxidants - a review[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2017, 67(1):5-18.
- [17] 张敏,侯宏晓,明建. 真空包装时塑料包装材料的透氧性对猪肉品质的影响[J]. 中国包装, 2006, 26(1):78-81.
- [18] LUND M N, HEINONEN M, BARON C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: A review[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2011, 55(1):83-95.
- [19] KO W C, YU C C, HSU K C. Changes in conformation and sulfhydryl groups of tilapia actomyosin by thermal treatment[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(8):1316-1320.
- [20] FILGUERAS R, GATELLIER P, AUBRY L, et al. Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat during air- and vacuum packaged storage: Influence of muscle on oxidative processes[J]. Meat Science, 2010, 86(3):665-673.
- [21] AGNÈS M, YVES M, PENKA M, et al. Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(7):2481-2487.
- [22] ZAKRYS-WALIWANDER P I, O'SULLIVAN M G, O'NEILL E E, et al. The effects of high oxygen modified atmosphere packaging on protein oxidation of bovine *M. longissimus* dorsi muscle during chilled storage[J]. Food Chemistry, 2012, 131(2):527-532.
- [23] MORA L, ESCUDERO E, FRASER P D, et al. Proteomic identi-



- fication of antioxidant peptides from 400 to 2500 Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction[J]. Food Research International, 2014, 56(2): 68-76.
- [24] WU G, CLERENS S, FAROUK M M. LC MS/MS identification of large structural proteins from bull muscle and their degradation products during post mortem storage[J]. Food Chemistry, 2014, 150(4): 137-144.
- [25] 孙金辉,李瑞成,李兴艳,等.冻藏条件对鸡肉品质的影响[J]. 食品科学, 2013, 32(2): 307-311.
- [26] 诸永志,宋玉,王道营,等. 3种肉鸡宰后蛋白质的降解及滋味前体物质的变化[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(6): 1434-1438.
- [27] KAJAKSIEMASZKO K, AUBRY L, PEYRIN F, et al. Characterization of protein aggregates following a heating and freezing process[J]. Food Research International, 2011, 44(10): 3160-3166.
- [28] LUND M N, HEINONEN M, BARON C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: A review[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2011, 55(1): 83-95.
- [29] ZHANG W, XIAO S, AHN D U. Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013, 53(11): 1191-1201.
- [30] RUTHERFURD S M, MONTOYA C A, MOUGHAN P J. Effect of oxidation of dietary proteins with performic acid on true ileal amino acid digestibility as determined in the growing rat[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(3): 699-707.
- [31] LIU Q, LANARI M C, SCHAEFER D M. A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality[J]. Journal of animal science, 1995, 73(10): 3131-3140.
- [32] PEARSON A M, JANE D, LOVE F B, et al. 'Warmed-Over' flavor in meat, poultry, and fish[J]. Advances in Food Research, 1977, 23(8): 1-7.
- [33] ZHOU F, ZHAO M, SU G, et al. Binding of aroma compounds with myofibrillar proteins modified by a hydroxyl-radical-induced oxidative system[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(39): 9544-9552.
- [34] PENNINGS B, BOIRIE Y, SENDEN J M, et al. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2011, 93(5): 997-1005.

(责任编辑:张震林)