

发酵剂及猕猴桃蛋白酶促进马肉发酵香肠蛋白质的降解

玉素甫·苏来曼, 阿尔祖古丽·阿卜杜外力, 巴吐尔·阿不力克木
(新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要: 为了提高马肉发酵香肠的品质, 添加发酵剂和猕猴桃蛋白酶, 促进其发酵成熟和肌肉蛋白质的降解。以新鲜马肉和马脂肪为原料, 分别设计三个试验组, 一组为对照组, 另两组为处理组; 对照组不采取处理, 而两个处理组添加 2% 的发酵剂和 0.05% 的猕猴桃蛋白酶, 并在相应条件下进行发酵, 检测其总氮、非蛋白氮等指标, 并通过 SDS-PAGE 电泳分析其肌肉蛋白质的降解情况。结果表明, 灌肠后 (0 d) 各组总氮含量为 3.09 g/100 g 左右, 而加工结束后 (28 d), 对照组 (CK 组)、发酵组 (A 组)、猕猴桃蛋白酶组 (B 组) 总氮含量分别是 3.41 g/100 g、3.85 g/100 g 及 4.15 g/100 g, 说明总氮含量明显上升, 并且发酵剂和猕猴桃蛋白酶的影响显著; 28 d CK 组、A 组、B 组非蛋白氮含量分别为 0.42 g/100 g、0.52 g/100 g、0.65 g/100 g, 与 0 d 非蛋白氮含量 0.22 g/100 g 相比, CK 组上升 1.9 倍, A 组上升 2.4 倍, B 组上升 2.9 倍; SDS-PAGE 电泳结果表明, 在整个加工过程中 A 组与 B 组肌浆蛋白逐渐发生降解, 大分子条带发生了明显的变化, 发酵剂对马肉发酵香肠肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的降解有显著的促进作用, 猕猴桃蛋白酶对肌浆蛋白的影响显著, 并比发酵剂大, 但对肌原纤维蛋白的作用不大。

关键词: 发酵香肠; 猕猴桃蛋白酶; 蛋白质降解; SDS-PAGE

文章编号: 1673-9078(2019)02-54-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.008

Starter and Actinidin Promote Protein Degradation of Horse Meat Fermented Sausage

YUSUFU Sulaiman, AERZUGULI Abuduwalli, BATUER Abulikemu

(Department of Food Science and Pharmacy of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: In order to improve the quality of horse meat fermented sausage, starter and actinidin were added to promote the fermentation mature and degradation of muscle protein. Fresh horse meat and horse fat were chose as raw materials. Three test groups were designed. One was the control group and the other two groups were the treatment group. The two treatment groups added 2% starter and 0.05% actinidin, and fermented under the corresponding conditions. the contents of total nitrogen, non-protein nitrogen were detected. The degradation of muscle protein was analyzed by SDS-PAGE. Results showed that the total nitrogen content of each group (0 d) was about 3.09 g/100 g. After processing (28 d), the total nitrogen content of control group (CK group), fermentation group (group A) and actinidin group (group B) were 3.41 g/100 g, 3.85 g/100 g and 4.15 g/100 g, respectively, indicating that the total nitrogen content increased significantly. The effects of starter and actinidin on protein degradation were significant. The non-protein nitrogen contents of the CK group, A group, B group on 28 d were 0.42 g/100 g, 0.52 g/100 g, 0.65 g/100 g respectively. Compared with 0 d (0.22 g/100 g), the non-protein nitrogen content of CK group increased by 1.9 times, group A increased by 2.4 times, group B increased by 2.9 times. Results of SDS-PAGE electrophoresis showed that the sarcoplasmic protein of group A and group B gradually degraded during the whole processing, and the macromolecular bands changed significantly. The starter significantly promoted the degradation of sarcoplasmic protein and myofibrillar protein of horse meat fermented sausage. Actinidin can also promote the sarcoplasmic protein degradation and have better effect than starter, but it has little effect on myofibrillar protein.

Key words: fermented sausage; actinidin; protein degradation; SDS-PAGE

收稿日期: 2018-09-27

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31260381)

作者简介: 玉素甫·苏来曼 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工

通讯作者: 巴吐尔·阿不力克木 (1968-), 男, 教授, 研究方向: 肉品加工与质量控制

发酵香肠是以动物肉和脂肪作为原料,添加发酵剂、外源酶、食盐、硝酸盐或亚硝酸盐、糖和香辛料等辅料,经绞碎、混合制馅后,灌入天然肠衣或者人造肠衣,在自然或人工条件下,利用微生物发酵作用,使其具有特殊风味、色泽和质地特点,种类繁多的肉制品^[1]。传统发酵香肠成熟周期长、成本高、质量不稳定,因而制约了工业化生产^[2]。近年来,国内外一些学者通过利用发酵剂和外源蛋白酶,试图生产质量比传统方法生产的香肠更好、更安全的香肠。Ansorena等^[3]在发酵香肠中添加微生物蛋白酶,发现非蛋白氮(Non-protein nitrogen, NPN)含量比对照组显著提高及产品风味也很好。段艳^[4]在羊肉发酵香肠中添加木瓜蛋白酶,结果表明木瓜蛋白酶组蛋白质含量始终低于对照组及感官品质明显提高。

马肉的营养价值很高,瘦肉多、脂肪含量低(4.7%),且多不饱和脂肪酸占总脂肪含量的61%~65.5%;蛋白质含量高(19.8%~24.4%),比羊肉和猪肉高,略微高于牛肉;赖氨酸和苏氨酸(1.57 g/100 g和0.84 g/100 g)含量高,色氨酸含量低(0.15 g),胆固醇含量远低于牛羊猪肉^[5]。马肉与牛肉相比,很容易消化,相比于其他肉类,它是铁、磷、锌、铜和镁的良好来源^[6],尤其是铁含量相当于猪肉的5~6倍,牛肉的8~9倍,因此补血功能特别高^[7];并且马肉含有其他肉类所没有的约1%的糖原,它赋予了马肉特殊的风味^[8]。近几年,在日本、法国、德国、意大利等很多国家人们越来越青睐于马肉,在这些国家马肉已成为深受欢迎的肉食品之一。2010年,我国成为世界马肉最大生产国(201600 t),产量比第二位国家(墨西哥83200 t)的两倍还多^[9],但是马肉产品较少,原因是马肉肌纤维粗且较长,因此肉质较硬、嫩度较差等。尽管马肉香肠方面的研究已有报道,但是发酵剂及外源酶(猕猴桃蛋白酶)对马肉发酵香肠蛋白质降解影响的研究鲜有报道。

猕猴桃蛋白酶是新型发现的具有潜在利用价值的植物蛋白酶;它可以用作嫩肉剂、酒澄清剂等,可用于新鲜奶酪的生产^[10]。近年来,国外已有少数人做过猕猴桃蛋白酶在肉类嫩化的初步应用,并有研究证明猕猴桃蛋白酶比木瓜蛋白酶具有更好的嫩化效果^[11];Han等^[12]人研究发现用猕猴桃汁对腌肉制品具有嫩化效果;Aminlari等^[13]人研究猕猴桃蛋白酶对牛肉的影响发现,猕猴桃巯基蛋白酶对牛肉作用比其他植物巯基蛋白酶要温和;猕猴桃蛋白酶还具有助于防止果冻凝固、美容祛斑等功能^[14]。目前市场上制作的嫩肉粉一般是菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、生姜蛋白酶以及无花果蛋白酶等,都是含巯基肽链内切酶,具有蛋白酶

和酯酶的活性,有较广泛的特异性,对动植物蛋白、多肽、酯、酰胺等有较强水解能力以及合成功能,能把蛋白水解物合成为类蛋白质^[15]。但国内对于猕猴桃蛋白酶的研究很少,所以对猕猴桃蛋白酶的研究利用,不仅可以开发利用天然资源,也为其在食品领域的应用提供理论依据,增加新的酶源。

本实验以新鲜马肉和马脂肪作为原料,添加LyocamiPRO-MIX5商业发酵剂和猕猴桃蛋白酶及香辛料等辅料制作马肉发酵香肠,研究发酵剂和猕猴桃蛋白酶对马肉发酵香肠加工过程中总氮、非蛋白氮等指标的影响,并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的降解情况进行分析,并为其日后的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料:新鲜马肉,从乌鲁木齐市沙依巴克区和田街新朱兰清牛羊肉配送中心购置。肠衣,直径2~3.5 cm,从乌鲁木齐市沙依巴克区老满城街羊肉零售店购置;亚硝酸钠、Vc本实验室提供;食盐、辣椒、花椒等调味料均购自乌鲁木齐市友好超市。

发酵剂:Lyocami PRO-MIX5混合商业发酵剂,包括木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus paraplantarum*)、沙克乳酸菌(*Lactobacillus sakei*)购自意大利萨科中国分公司。

猕猴桃蛋白酶:酶活力 ≥ 500 U/mg,购自上海鼓臣生物技术有限公司。

药品试剂:二水合磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化镁、氯化钾、EGTA、迭氮钠、Triton-X-100、氯化钠、Tris、盐酸、甘油、SDS、 β -巯基乙醇、溴酚蓝、甲醇、冰醋酸、考马斯亮蓝R-250、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵,TEMED等。

1.2 主要仪器设备

85-2A双向恒温磁力搅拌器,金坛市医疗仪器厂;DK-8D电热恒温水槽,上海一恒科技有限公司;Beckman Avanti-J-26S XPI落地式高速冷冻离心机,美国Beckman Coulter有限公司;FSH-2可调高速匀浆机,武汉格莱莫检测设备有限公司;Food ALYT D4000凯氏定氮仪,德国Omnilab-laborzentrum GmbH & Co.KG公司;DYY-7C型电泳仪,北京市六一仪器厂;TY-80R脱色摇床,金坛市医疗仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 马肉发酵香肠的制作与取样

参考王恺^[16]的配方并略微改善。

工艺流程:

选择鲜马肉和马脂肪→预处理→腌制→拌料→接种→灌肠→浸洗→发酵→干燥→成熟→成品

马肉的选择和处理: 选择 10 kg 左右的新鲜马肉和 2 kg 左右的马脂肪切丁, 轻微冷冻 1~2 d, 瘦肉和肥肉以 8:2 比例混合。

腌制: 以混合后的马肉重量为计, 添加食盐 2.3%、亚硝酸钠 0.01%, 在 0~4 °C 腌制 12~15 h。

拌料: 腌制结束后以肉馅重量为计添加蔗糖 1%、葡萄糖 1%、Vc 0.1%、味精 0.1%、黑胡椒 0.2%、白胡椒 0.1%、肉桂 0.014%、肉蔻 0.006%、丁香 0.035%、辣椒粉 0.05%、孜然粉 0.23%、姜粉 0.1%、蒜粉 0.1% 混合。

接种与酶处理: 将拌料好的肉平均分为三组, 一组为对照组(CK), 其余两组都按肉重的 2% 添加发酵剂(A、B), 接种之前将发酵剂用脱脂牛奶和维生素 C 在 37 °C 下, 活化 2~3 h。B 组中, 按肉重的 0.05% 添加猕猴桃蛋白酶, 添加前将猕猴桃蛋白酶用 10 mL 蒸馏水溶解。

灌肠: 将处理后的肉丁灌入到清理后直径为 2~3.5 cm 肠衣中。

浸洗: 将灌制后的香肠, 将其用 40 °C 的温水浸洗至出尽表面杂物。

发酵: 将浸洗后的香肠在温度为 25 °C、湿度(RH)为 90%~96% 的条件下发酵 2 d。

干燥: 将发酵后的香肠在一定条件下干燥。干燥前期条件为温度 14~15 °C、RH 80%~90%、时间 2 d; 干燥后期条件为温度 14~15 °C、RH 75%~80%、时间 3 d。

成熟: 将干燥后的香肠在温度为 10~11 °C、RH 65%~70% 条件下成熟 21 d。

取样: 每组分别于灌肠后(0 d)、发酵期(2 d)、干燥期(7 d)、成熟期(14 d、21 d、28 d)

6 个工艺点取样, 置于 -20 °C 冷冻保藏, 每个样品重复三次测定指标。

1.3.2 总氮的测定

参照张雪梅^[17]的测定总氮含量的方法并略作修改。

1.3.3 非蛋白氮含量的测定

参考朱健辉^[18]的方法, 并略作修改。将样品自然解冻后, 剔除可见脂肪和结缔组织, 切碎, 称取 5 g 左右(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 40 mL 蒸馏水, 高速匀浆机匀浆 3 次, 于 4 °C 下放置 1 h 后,

3000 r/min 离心 15 min, 用快速滤纸过滤, 取 10 mL 滤液加入等体积的 10% 三氯乙酸混合均匀, 室温静置 30 min, 2500 r/min 离心 15 min, 过滤, 取 10 mL 滤液用凯氏定氮消化。

1.3.4 肌浆蛋白

肌浆蛋白的提取参考 Molina I 等^[19]的方法: 准确称取 10 g 肉样于 50 mL 离心管中, 加入 30 mL 0.2 mol/L, pH 6.5 的 PBS(甲液: NaH₂PO₄·2H₂O 31.21 g/L; 乙液: Na₂HPO₄·12H₂O 71.64 g/L; 甲:乙=1:2) 混合均匀, 在冰浴条件中 3000 r/min 匀浆 20 min 后, 再 10000 r/min 4 °C 离心 20 min, 上清液即为肌浆蛋白提取液。

1.3.5 肌原纤维蛋白的降解变化

参考 Fadda S 等的方法^[20]的方法并略作修改。首先取 5 g 肉样剪碎于 50 mL 离心管中, 加 15 mL 标准盐溶液(100 mmol/L KCl、20 mmol/L KH₂PO₄、2 mmol/L MgCl₂·6H₂O、2 mmol/L EGTA、1 mmol/L NaN₃) 匀浆 25 s, 2500 r/min 离心 150 min, 弃上清(含 CAF 和肌浆蛋白), 此步骤重复 4 次; 然后向沉淀中加 15 mL 标准盐溶液+1% Triton X-100 溶液, 匀浆 10 s, 离心 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清取沉淀, 并重复 3 次; 此后沉淀中加入 10 mL, 0.01 mol/L KCl 溶液, 用玻璃棒剧烈搅拌, 4000 r/min 离心 10 min, 重复 3 次; 最后向沉淀中加入 8 倍体积的 100 mmol/L NaCl 溶液, 剧烈震荡, 使沉淀悬浮于溶液中, 4000 r/min 离心 5 min, 取沉淀, 重复两次; 沉淀即为肌原纤维蛋白。

1.3.6 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 软件进行数据统计分析, 用 SPSS19.0 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 发酵剂和酶处理对马肉发酵香肠总氮含量的影响

由图 1 可知, 随着发酵时间的延长各组总氮含量呈先略下降, 后迅速上升, 再略下降趋势, 并各组间和组内差异显著 ($p < 0.05$)。0 d 各组总氮含量为 3.09 g/100 g 左右, 到 28 d CK 组、A 组、B 组总氮含量分别上升为 3.41 g/100 g、3.85 g/100 g 及 4.15 g/100 g。在 0~2 d 各组总氮含量均呈略微下降趋势, 原因是水溶性蛋白质随着水分含量的渗出流失而造成的, 但是 B 组总氮含量的下降比 CK 组与 A 组小, 这可能是猕猴桃蛋白酶的保水作用^[21]。在 2~21 d 各组总氮含量呈明显上升趋势 ($p < 0.05$), 2 d CK 组、A 组、B 组的总

氮含量由 2.72 g/100 g、2.79 g/100 g、2.99 g/100 g 分别上升为 21 d 的 3.61 g/100 g、4.03 g/100 g、4.28 g/100 g，且 A 组与 B 组的总氮含量均高于 CK 组，B 组总氮含量的变化最大，说明组织蛋白酶、发酵剂以及添加的猕猴桃蛋白酶促进蛋白质降解产生大量的多肽、短肽、游离氨基酸以及部分风味成分。在 21~28 d 各组总氮含量均呈缓慢的下降趋势，这可能是一方面由于随着各组香肠水分含量大量散失，盐浓度继续增大，导致抑制蛋白酶活性降低，从而使蛋白质降解变慢，这与吕舒^[22]和孙霞^[23]的实验结果一致。另一方面，此阶段微生物处于衰亡期，因此蛋白质降解变慢。

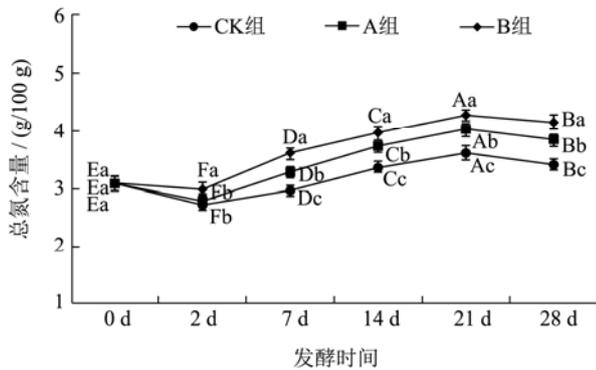


图 1 马肉发酵香肠在发酵过程中总氮含量的变化

Fig.1 Changes of total nitrogen content during fermentation of horse meat fermented sausage

注：不同大写字母表示组内差异显著 ($p < 0.05$)，不同小写字母表示组间差异显著 ($p < 0.05$)。

2.2 发酵剂和酶处理对马肉发酵香肠非蛋白氮的影响

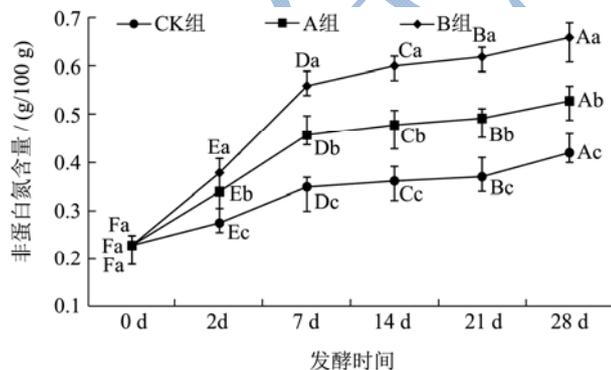


图 2 马肉发酵香肠在发酵过程中非蛋白氮含量的变化

Fig.2 Changes of non-protein nitrogen content during fermentation of horse meat fermented sausage

注：不同大写字母表示组内差异显著性 ($p < 0.05$)，不同小写字母表示组间差异显著 ($p < 0.05$)。

非蛋白氮是指除了蛋白质以外的游离氨基酸、多肽和短肽的总含量，蛋白质降解重要的指标，是马肉

香肠形成风味的重要前提物质^[24]。

由图 2 可知，整个加工过程中各组非蛋白氮含量均呈上升趋势，这与 Diaz 等^[25]的研究结果相似。0 d 各组非蛋白氮含量为 0.22 g/100 g，28 d CK 组、A 组、B 组非蛋白氮含量分别上升为 0.42 g/100 g、0.52 g/100 g、0.65 g/100 g，并各组间组内差异显著 ($p < 0.05$)。在 0~7 d 各组的非蛋白氮含量呈迅速上升趋势，原因是此时的环境温湿度较高，因此，一方面微生物大量生长，另一方面高温促进了组织蛋白酶和寡肽酶等酶类物质的活性增高，使蛋白质水解产生大量的游离氨基酸及肽类小分子物质，这与韩鲜娜^[26]的试验结果相似；A、B 组与 CK 组相比，非蛋白氮含量上升速度较快，B 组的最快，说明马肉发酵香肠加工过程中除了组织蛋白酶之外，微生物产生的蛋白酶以及猕猴桃蛋白酶也起了重要作用。在 7~21 d CK 组、A 组、B 组非蛋白氮含量由 0.35 g/100 g、0.46 g/100 g、0.56 g/100 g 缓慢上升为 0.37 g/100 g、0.49 g/100 g、0.62 g/100 g，并差异显著 ($p < 0.05$)，可能是一方面温度的降低抑制酶类活性和微生物的生长，另一方面环境湿度的降低导致了香肠水分含量的不断降低，直接影响盐浓度升高，高浓度盐抑制了组织蛋白酶活性，从而使蛋白质降解变慢；另一种可能性，前 7 d 积累的一部分肽类物质和游离氨基酸参与形成挥发性风味物质。在 21~28 d 各组非蛋白氮含量又呈略微上升趋势，原因是水分散失导致盐含量增大，蛋白质结构遭到破坏，使蛋白酶更易起作用^[27]。

2.3 发酵剂和酶处理对马肉发酵香肠对肌肉蛋白质降解的影响

2.3.1 对肌浆蛋白降解的影响

由图 3 可知，在整个加工过程中 CK 组肌浆白蛋白条带发生一些变化。腌制结束之后 94 ku、66.2 ku 附近的条带完全消失，66.2 ku、45 ku、33 ku、14 ku 处的条带明显变细，14~33 ku 之间形成了一些新条带，这说明盐溶性蛋白发生了变化^[28]。在 2 d，94 ku 位置形成了新条带，并变粗，21 d 消失。66.2 ku、26~33 ku 之间位置的条带 1~28 d 逐渐变粗。在 7 d，45~66.2 ku 之间的位置形成了新条带，至 28 d 没有变化。在 0~28 d，45 ku、26 ku 位置的条带逐渐变细。在 2 d，14~26 ku 位置形成了一些新条带并且逐渐变粗。在 2 d，14 ku 下面的条带完全消失。14.4 ku 位置的条带从 0~2 d 变暗，从 2~28 d 逐渐变深。

由图 4 可知，在整个加工过程中，A 组肌浆蛋白发生了明显变化。A 组与 CK 组相比，14 d 附近 94 ku

位置形成了新条带, 21 d 完全消失。随着发酵过程的延长 62 ku 的条带 0~21 d 的逐渐变粗, 28 d 变细。0~21 d 在 26~33 ku 位置的条带比 CK 组变更粗, 28 d 变细。与 CK 组相比, 从 7 d 开始 26 ku 位置的条带明显变暗, 28 d 的全部条带比 21 d 的条带变细变暗, 20 ku 位置的条带变得更浅。

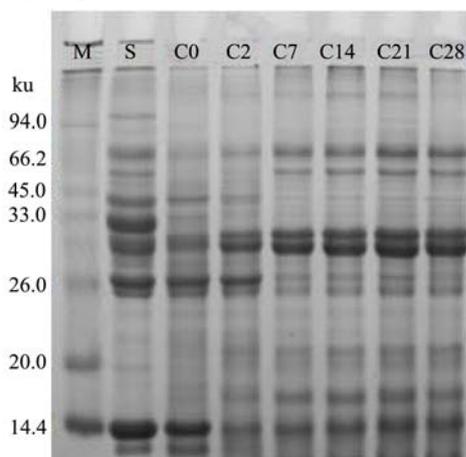


图 3 发酵过程中对照组马肉发酵香肠肌浆蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis of sarcoplasmic protein from horse meat fermented sausage in the control group during the fermentation

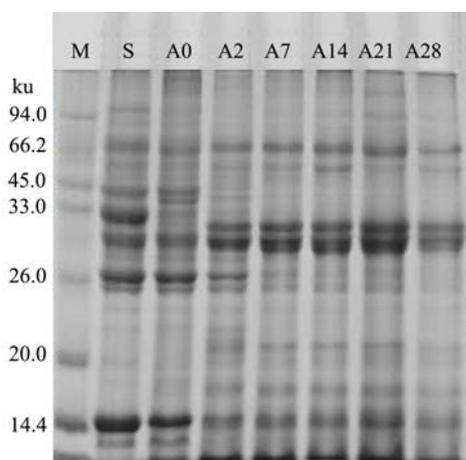


图 4 发酵过程中发酵组马肉发酵香肠肌浆蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis of sarcoplasmic protein from horse meat fermented sausage in fermented group during the fermentation

由图 5 可知, 随着发酵过程的延长, B 组肌浆蛋白发生了明显变化。与 CK 组相比, 在 94 ku 附近, 14 d 形成了一个新条带, 到 21 d 变粗, 28 d 消失。在 66.2~94 ku 位置, 2 d 形成了两个新条带, 一直到 21 d 变粗, 28 d 消失。66.2 ku 位置的条带, 从 0 d 开始变粗至 14 d, 从 21 d 开始变细到 28 d。45~66.2 ku 位置, 14 d 形成了一个新条带, 21 d 变粗, 28 d 消失。26~33

ku 位置的条带从 0~14 d 变粗, 14~28 d 变细。26 ku 位置的条带 0~2 d 变细。7 d 完全消失以及形成了一些细条带。14.4~26 ku 位置的大部分条带变浅或者完全消失。14.4 ku 位置的条带变细变暗。

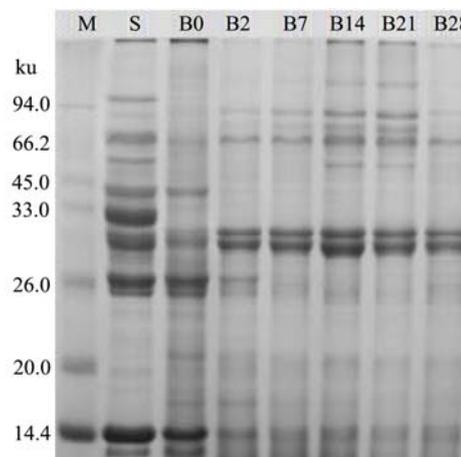


图 5 发酵过程中猕猴桃蛋白酶组马肉发酵香肠肌浆蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE electrophoresis of sarcoplasmic protein from horse meat fermented sausage in actinidin group during the fermentation

与 CK 组相比, A 组 26~33 ku 位置的条带从 0~21 d 变粗, 28 d 变细, 但是 B 组此位置的条带从 0~14 d 变粗, 14~28 d 变细。A 组 26 ku 位置的条带从 7 d 开始变暗, 但是 B 组此处的条带从 7 d 消失并没有形成新条带。

2.3.2 对肌原纤维蛋白降解的影响

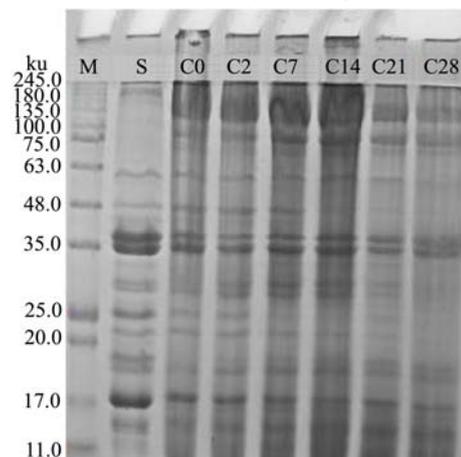


图 6 发酵过程中对照组马肉发酵香肠肌原纤维蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.6 SDS-PAGE electrophoresis of myofibrillar protein from horse meat fermented sausage in the control group during the fermentation

由图 6 可知, 在整个加工过程中 CK 组肌原纤维蛋白的变化不明显^[29]。与 S (原料肉) 相比, 0 d 在 63~245 ku 位置形成了三个条带, 并且逐渐变粗到 28

d。28 d 在 63 ku 位置的条带消失。48 ku 位置的条带 14 d 变暗, 21 d 消失。2 d 在 20 ku 附近形成了新条带。17~75 ku 位置的大部分条带, 21~28 d 变暗或者消失。

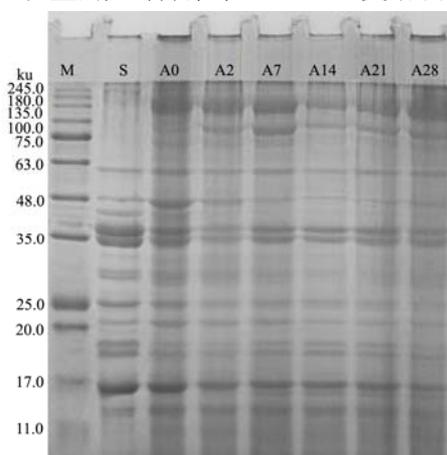


图7 发酵过程中发酵组马肉发酵香肠肌原纤维蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.7 SDS-PAGE electropherogram of myofibrillar protein from horse meat fermented sausage in the fermented group during the fermentation

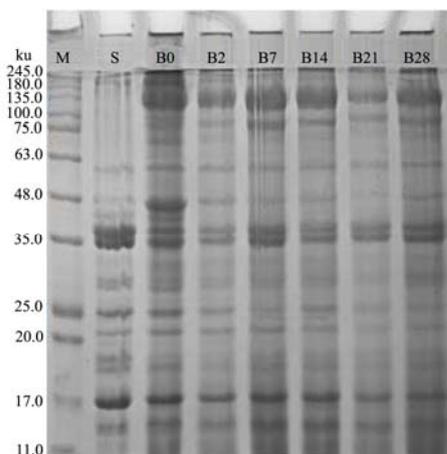


图8 发酵过程中猕猴桃蛋白酶组马肉发酵香肠肌原纤维蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.8 SDS-PAGE electropherogram of myofibrillar protein from horse meat fermented sausages in the actinidin group during the fermentation

由图7可知,随着加工时间的延长,A组肌原纤维蛋白发生了一定的变化。100 ku附近的条带0~14 d变粗,21 d变细。14 d在75 ku位置的条带完全消失。48 ku位置的条带从2 d开始到28 d逐渐变细。25~35 ku位置的条带从0 d开始变暗,28 d消失。7 d在附近17 ku位置形成了一个细条带到28 d一直没有变化。

由图8可知,整个加工过程中,与CK组与A组相比,B组的肌原纤维蛋白的变化不大。2~14 d在附近245 ku位置的条带逐渐变细,21 d消失,同样75 ku位置的条带2~14 d变暗,21 d消失。48 ku位置的条

带从2~28 d逐渐变暗。2 d在35~48 ku位置的条带,完全消失。17~35 ku位置的条带14 d变暗,但是28 d变深或者变粗;原因可能是随着水分散失,盐含量增大,蛋白质结构遭到破坏,组织蛋白酶、微生物产生的蛋白酶及猕猴桃蛋白酶更容易降解蛋白质形成新的条带^[30]。

3 结论

蛋白质降解是发酵香肠成熟过程中的重要生化反应,蛋白质降解产生的小分子物质,如多肽、小肽、氨基酸对其风味物质的形成和质地起着重要的作用。本文选用的发酵剂及猕猴桃蛋白酶对马肉发酵香肠的总氮和非蛋白氮含量的影响显著($p < 0.05$);通过检测蛋白质变化,并 SDS-PAGE 电泳图分析可知,发酵剂显著促进马肉发酵香肠肌浆蛋白和肌原纤维蛋白的降解;猕猴桃蛋白酶对肌浆蛋白降解的影响比发酵剂大,但对肌原纤维蛋白的降解影响较发酵剂小;通过蛋白质降解和之前的感官评价来看,猕猴桃蛋白酶对马肉香肠品质的影响较发酵剂大。

参考文献

- [1] Liu E Q, Wu Y H, Zhang J P, et al. Shortening fermentation period of fermented sausage by adding exogenous enzymes [J]. *Advanced Materials Research*, 2014, 941: 1146-1150
- [2] Yang H, Zhang L, Li-Zhen M A, et al. Effect of exogenous enzymes on shortening ripening period of fermented mutton sausage [J]. *Food Science*, 2010, 15: 81-86
- [3] Ansorena D, Zapelena M J, Astiasarán I, et al. Simultaneous addition of palatase M and protease P to a dry fermented sausage (Chorizo de Pamplona) elaboration: Effect over peptidic and Lipid fractions [J]. *Meat Science*, 1998, 50(1): 37-44
- [4] 段艳.乳酸菌的筛选及其对羊肉干发酵香肠品质特性的影响[D].呼和浩特市:内蒙古农业大学,2013
DUAN Yan. Screening of lactic acid bacteria and its effect on quality characteristics of mutton fermented sausage [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013
- [5] 孔令明,李芳,张文,等.不同电刺激处理时间对宰后马肉成熟过程中嫩度的影响[J].*食品科学*,2018,39(9):76-81
KONG Ling-ming, LI Fang, ZHANG Wen, et al. Effect of electrical stimulation on horse meat tenderness during postmortem aging [J]. *Food Science*, 2018, 39(9): 76-81
- [6] Alagić, Kozačinski L, Filipović I, et al. Microbial changes during ripening of fermented horse meat sausages [J]. *Meso Prvi Hrvatski Časopis O Mesu*, 2008, 10(3): 200-203

- [7] Badiani A, Nanni N, Gatta P P, et al. Nutrient profile of horsemeat [J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 1997, 10(3): 254-269
- [8] 赵立男,热夏提达·吾来提,杨随霞,等. 马肉不同部位的品质特性分析[J]. *肉类研究*, 2013, 27(7): 35-39
ZHAO Li-nan, RE Xia-ti-da·WU Lai-ti, YANG Sui-xia, et al. Analysis of quality characteristics of different parts of horse meat [J]. *Meat Research*, 2013, 27(7): 35-39
- [9] 杨红,徐明华. 1961-2010 年世界马肉生产与效率分析[J]. *经济研究导刊*, 2012, 29: 31-33
YANG Hong, XU Ming-hua. Analysis of world horse meat production and efficiency from 1961 to 2010 [J]. *Economic Research Guide*, 2012, 29: 31-33
- [10] Katsaros G I, Tavantzis G, Taoukis P S, et al. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010, 11(1): 47-51
- [11] 王海丽. 软枣猕猴桃蛋白酶的提取分离与嫩化牛肉效果的研究[D]. 延吉: 延边大学, 2013
WANG Hai-li. Study on the extraction and separation of soft kiwifruit protease and tenderized beef [D]. Yanji: Yanbian University, 2013
- [12] Han J, Morton J D, Bekhit A E, et al. Pre-rigor infusion with kiwifruit juice improves lamb tenderness [J]. *Meat Science*, 2009, 82(3): 324-330
- [13] Aminlari M, Shekarforoush S S, Gheisari H R, et al. Effect of actinidin on the protein solubility, water holding capacity, texture, electrophoretic pattern of beef, and on the quality attributes of a sausage product [J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74(3): 221-226
- [14] Hashim M M, Mingsheng D, Iqbal M F, et al. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(6): 458-464
- [15] Kamphuis I G, Drenth J, Baker E N, et al. Thiol proteases: Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1985, 182(2): 317-329
- [16] 王恺. 三种乳酸菌发酵剂在发酵香肠中的应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013
WANG Kai. Application of three lactic acid bacteria starter in fermented sausage [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013
- [17] 张雪梅. 四川香肠生产过程中理化特性、微生物特性及产葡萄球菌的筛选与应用[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010
ZHANG Xue-mei. Physicochemical properties, microbial characteristics and screening and application of *Staphylococcus aureus* in Sichuan sausage production [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2010
- [18] 朱健辉. 不同等级金华火腿蛋白质和脂肪水解产物与挥发性风味物质分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2005
ZHU Jian-hui. Analysis of protein and fat hydrolysate and hair flavor substances of different grades of Jinhua ham [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005
- [19] Molina I, Toldra F. Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham [J]. *Journal of Food Science*, 1992, 57(6): 1308-1310
- [20] Fadda S, Sanz Y, Vignolo G, et al. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3540-3546
- [21] Aminlari M, Shekarforoush S S, Gheisari H R, et al. Effect of actinidin on the protein solubility, water holding capacity, texture, electrophoretic pattern of beef, and on the quality attributes of a sausage product [J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74(3): C221-C226
- [22] 吕舒. 四川香肠加工贮藏过程中表层、中层、内层的理化特性及微生物的变化[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014
LYU Shu. Physicochemical properties and microbial changes in the surface, middle and inner layers of Sichuan sausage during processing and storage [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2014
- [23] 孙霞, 巩洋, 杨勇, 等. 接种混合发酵剂生产的低酸度川味香肠加工过程中的蛋白质降解[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(13): 66-71
SUN Xia, GONG Yang, YANG Yong, et al. Protein degradation during processing of low acidity Sichuan sausages inoculated with mixed starter [J]. *Food Science and Technology*, 2015, 36(13): 66-71
- [24] Soriano A, Garcia R A, Gomez E, et al. Lipolysis, proteolysis, physicochemical and sensory characteristics of different types of Spanish ostrich salchichon [J]. *Meat Science*, 2007, 75(4): 661-668
- [25] Díaz O, Fernández M, Fernando G D G D, et al. Effect of the addition of papain on the dry fermented sausage proteolysis [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2015, 71(1): 13-21
- [26] 韩鲜娜. 新疆熏马肠强化接种与内源酶调控技术研究[D]. 石河子市: 石河子大学, 2013
HAN Xian-na. Study on intensive inoculation and

- endogenous enzyme control techniques of smoked horse in Xinjiang [D]. Shihezi: Shihezi University, 2013
- [27] Zhao G M, Zhou G H, Wang Y L, et al. Time-related changes in cathepsin B and L activities during processing of Jinhua ham as a function of pH, salt and temperature [J]. *Meat Science*, 2005, 70(2): 381-388
- [28] Hughes M C, Kerry J P, Arendt E K, et al. Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages [J]. *Meat Science*, 2002, 62(2): 205-216
- [29] Fadda S, Sanz Y, Vignolo G, et al. Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3540-3546
- [30] Candogan K, Wardlaw F B, Acton J C, et al. Effect of starter culture on proteolytic changes during processing of fermented beef sausages [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(3): 731-737

现代食品科技