

# 生姜提取物抑制培根风干成熟过程中的亚硝化反应

顾如霞, 葛凤芹, 刘步云, 李锋, 王永丽\*

(山东农业大学食品科学与工程学院, 山东省高校食品加工技术与质量控制重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘要:** 研究生姜提取物的体外抗氧化能力及总酚含量, 并以干腌培根为研究对象, 研究不同添加量(0.15%、0.30%、0.45%和0.75%)的生姜提取物对中式培根风干成熟过程中亚硝化的影响。结果表明, 永康黄姜提取物具有较强的 ABTS<sup>+</sup>和 DPPH 自由基清除效能。亚硝酸盐含量随着风干时间的延长显著降低 ( $p<0.05$ ), 风干结束时 0.75%添加量处理组与对照组差异显著 ( $p<0.05$ ), 亚硝酸盐残留量为 15.91 mg/kg, 与对照组相比降低了 41.55%。风干 12 d, 0.45%添加量处理组显著抑制 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)生成 ( $p<0.05$ ), 比对照组降低了 8.55%。原料肉和腌制后各处理组样品中均无 *N*-二甲基亚硝胺(*N*-nitrosodimethylamine, NDMA)检出, 随着风干时间的延长, 各处理组中 NDMA 检出量均显著增加 ( $p<0.05$ )。风干结束时, 0.75%处理组 NDMA 含量最低, 为 0.65  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 比对照组降低了 36.89%。用液相色谱-质谱联用仪从生姜提取物中共鉴定出 13 种有效成分。综上所述, 生姜提取物可有效抑制培根风干成熟过程的亚硝化反应, 为明确生姜提取物抑制亚硝酸盐、3-NT 和亚硝胺的物质基础及提高肉品安全品质提供了科学依据。

**关键词:** 生姜提取物; 亚硝酸盐; 亚硝胺; 抗氧化; 总酚

文章编号: 1673-9078(2022)09-198-205

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1319

## Inhibition of Nitrosation in Dry-cured Bacon by Ginger Extract

GU Ruxia, GE Fengqin, LIU Buyun, LI Feng, WANG Yongli\*

(College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Key Laboratory of Food Processing Technology and Quality Control in Shandong Province, Taian 271018, China)

**Abstract:** *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ginger extract were investigated. Four concentrations of ginger extract (0.15%, 0.30%, 0.45%, and 0.75%) were added during the salting process of dry-cured bacon to study the effect on nitrate and nitrosamine content in the bacon. High free radical scavenging activity of DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals was demonstrated using ginger extract. The nitrite content decreased during dry-curing ( $p<0.05$ ). At the end of the curing process, the bacon treated with 0.75% ginger extract had the lowest ( $p<0.05$ ) nitrite content (15.91 mg/kg), a 41.55% reduction compared to the control samples. The bacon treated with 0.45% ginger extract inhibited 3-nitrotyrosine content after 12 d drying ( $p<0.05$ ), a reduction of 8.55% compared to the control samples. Regardless of ginger treatment, *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) content was not detected in the raw material or at the end of the salting process; NDMA values gradually increased ( $p<0.05$ ) during dry-curing. The lowest NDMA content (0.65  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) was observed in the bacon treated with 0.75% ginger extract at the end of drying, a reduction of 36.89% compared to the control. The profile of ginger extract was analyzed using high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. A total of 13 compounds were identified. In summary, ginger extract effectively inhibited nitrosation during the curing process of bacon. This study scientifically elucidates the effect of ginger extract on the formation of nitrite, 3-nitrotyrosine, and nitrosamine in improving the safety and quality of meat.

**Key words:** ginger extract; nitrite; nitrosamine; antioxidant; total phenolic content

引文格式:

顾如霞,葛凤芹,刘步云,等.生姜提取物抑制培根风干成熟过程中的亚硝化反应[J].现代食品科技,2022,38(9):198-205

GU Ruxia, GE Fengqin, LIU Buyun, et al. Inhibition of nitrosation in dry-cured bacon by ginger extract [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 198-205

收稿日期: 2021-11-24

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31801569); 山东省重点研发计划(2019GNC106090); 山东省高等学校科技计划项目(J16LE18)

作者简介: 顾如霞(1996-),女,硕士研究生,研究方向:食品科学,E-mail:lily8941@163.com

通讯作者: 王永丽(1982-),女,博士,副教授,研究方向:畜产品加工与质量控制,E-mail:wylily@sdau.edu.cn

亚硝酸盐是在腌腊肉制品加工过程中被广泛使用的添加剂,能抑制腐败微生物的生长,有利于保护肉色,赋予产品独特的腌腊肉风味,并可延缓脂质氧化。但是,在肉制品加工过程中,亚硝酸盐、硝酸盐会和肉中蛋白质的降解产物氨基酸、胺类物质发生亚硝基化反应生成 *N*-亚硝胺<sup>[1]</sup>。摄入含过量亚硝胺的食物,会引起肝脏、肾脏及血小板的损伤,诱发食道癌等恶性消化系统疾病<sup>[2]</sup>。我国对食品中亚硝胺残留有严格的限制,GB 7677-1998 规定肉制品中 *N*-二甲基亚硝胺 (*N*-nitrosodimethylamine, NDMA) 最高不超过 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , *N*-亚硝胺总含量不得超过 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。美国食药局 (Food and Drug Administration, FDA) 规定零售食品中总 *N*-亚硝胺含量不得超过 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[3]</sup>。因此,研究控制腌腊肉制品生产过程中亚硝基化水平,降低亚硝酸盐和亚硝胺含量的生产工艺技术对于提高腌腊肉的安全品质具有重要意义。

酚类化合物具有清除自由基、抗炎症、抗氧化、螯合金属离子、抗癌和抗突变等作用<sup>[4,5]</sup>。富含多酚的果蔬成分或提取物,如葡萄籽提取物<sup>[6]</sup>、茶叶提取物<sup>[7]</sup>、浆果类<sup>[8]</sup>等在肉制品加工中已经广泛应用。生姜是一种药食两用的植物,也是重要的香辛调味料,其主要活性成分姜辣素和黄酮等都属于酚类化合物,可以通过清除自由基和螯合金属离子,起到抗菌、消炎、抑制氧化活性的功效<sup>[9]</sup>。在前期研究<sup>[10]</sup>中发现生姜提取物能有效抑制亚硝胺的前体物-生物胺的累积,本文以生姜提取物为原料,以 DPPH 自由基清除能力和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力为抗氧化指标,研究生姜提取物的体外抗氧化能力及总酚含量,并以干腌培根为研究对象,研究不同添加量 (0.15%、0.30%、0.45% 和 0.75%) 的生姜提取物对中式培根风干成熟过程中亚硝酸盐、3-NT 和亚硝胺的抑制效应。采用高效液相色谱串联质谱方法鉴定生姜提取物中的成分,以期获得抑制亚硝酸盐和亚硝胺累积的有效成分,为降低风干发酵肉制品有害成分形成,提高肉品品质提供一定的理论基础和技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜五花肉,购于泰安大润发超市双汇肉食专柜;永康黄姜由山东省莱芜市农科院提供。

*N*-二甲基亚硝胺 (NDMA), 美国 Sigma 公司; Folin-酚和 1,1-二苯基-2-苦基苯肼 (DPPH), 北京索莱宝科技有限公司; 四氢姜黄素 (Tetrahydrocurcumin,  $\geq 96\%$ )、没食子酸、6-姜酚 (6-gingerol,  $\geq 98\%$ )、

4-姜酚 (4-gingerol,  $\geq 98\%$ ) 和 1-脱氢-6-姜二酮 (1-dehydro-6-gingerdione,  $\geq 98\%$ ), 上海源叶生物科技有限公司; 姜酮 (Zingerone,  $\geq 98\%$ ) 和 6-姜烯酚 (6-shogaol,  $\geq 98\%$ ), 南京泽朗生物科技有限公司; 食品级亚硝酸钠 ( $\geq 99\%$ )、乙腈 (色谱纯)、甲醇 (色谱纯), 青岛正业试剂有限公司; 碳酸钠、乙酸锌、盐酸纳乙二胺、盐酸、氢氧化钠、二氯甲烷、无水硫酸钠和亚铁氰化钾等为分析纯, 上海国药集团。

### 1.2 仪器与设备

SpectraMax M2 多功能酶标仪, 美国 MD 公司; CTHI-250B 型恒温恒湿箱, STIK 仪器设备(上海)有限公司; 7890A/5975C 三重四级杆气质联用仪, 美国 Agilent 公司; LC-LTQ Orbitrap XL MS/MS 液相色谱-质谱联用仪, 美国 Thermo Fisher 公司; KH-400KDB 型高功率数控超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; Allegra 64R 型高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; IKAT18basic 型高速分散机, 德国 IKA 公司; DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科技有限公司; Turbo Vap LV 全自动浓缩工作站, 美国 Caliper 公司; LGJ-22D 冷冻干燥机, 北京四环科学仪器厂有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 生姜提取物的制备

样品洗净去皮、晾干后切成丝状,按料液比 (1:10, *m/V*) 用无水乙醇于 45  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中浸提 5 h。收集滤液后再用无水乙醇重复提取三次,合并所有滤液。将滤液用旋转蒸发仪浓缩成膏状,然后将浸膏溶于水中,加入等体积的乙酸乙酯充分震荡分层,收集乙酸乙酯层,重复 3 次。用旋转蒸发仪将乙酸乙酯有机层去除,得到膏状生姜提取物。生姜提取物通过 NKA-9 D101 大孔吸附树脂进行分离纯化,冷冻干燥后最终得到纯化的生姜提取物。准确称量 100 mg 纯化生姜提取物,用甲醇定容至 5 mL,配成质量浓度为 20 mg/mL 的储备液。

#### 1.3.2 生姜提取物中总酚含量的测定

参照 Magalhaes 等<sup>[11]</sup>的方法,将 2 mL 福林酚试剂加入 20 mL 比色管中,再加入 2 mL 溶有 0.1 g 生姜提取物的乙醇溶液,旋涡震荡后静置 3 min,再加入 2 mL 10% (*m/V*)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液,混合均匀后在室温下放置 1 h,在 760 nm 下测定吸光值。按照上述方法测定没食子酸标准溶液不同浓度梯度的吸光值,以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标制作标准曲线。由测得样品的吸光度根据标准曲线计算出样品中总酚的没食子酸当量浓度 (mg/g)。

### 1.3.3 生姜提取物清除 ABTS<sup>+</sup>自由基能力的测定

按照 Robert 等<sup>[12]</sup>的方法。将储备液配制质量浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mg/mL 的生姜提取物溶液，精确吸取 10 μL 不同质量浓度的提取物溶液样品，与 290 μL ABTS<sup>+</sup>自由基溶液混合均匀，避光条件下反应 15 min，在 734 nm 处测定其吸光值。根据下式计算样品对 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除率。

$$F = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

$F$ ——ABTS<sup>+</sup>自由基清除率，%；

$A_1$ ——ABTS<sup>+</sup>和样品在 734 nm 处的吸光值；

$A_0$ ——ABTS<sup>+</sup>和蒸馏水在 734 nm 处的吸光值；

$A_2$ ——样品和蒸馏水在 734 nm 处的吸光值。

### 1.3.4 生姜提取物清除 DPPH 自由基能力的测定

参照 Yang 等<sup>[13]</sup>的方法略做修改。将储备液配制浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mg/mL 的生姜提取物溶液，精确吸取 10 μL 不同梯度的提取物溶液样品，加 290 μL 0.1 mmol/L DPPH 自由基甲醇溶液，在 37 °C 水浴锅中保温 30 min，以 290 μL DPPH 溶液和 10 μL 蒸馏水的混合溶液为对照样品，于 517 nm 处分别测定吸光值  $A_1$  和  $A_0$ 。根据下式计算生姜提取液对 DPPH 自由基的清除率。

$$P = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中：

$P$ ——DPPH 自由基清除率，%；

$A_1$ ——DPPH 和样品在 517 nm 处的吸光值；

$A_0$ ——DPPH 和蒸馏水在 517 nm 处的吸光值；

$A_2$ ——样品和蒸馏水在 517 nm 处的吸光值。

### 1.3.5 培根的制作及取样

将新鲜五花肉分割成 25 cm×15 cm×5 cm 长方体，将肉块随机分成 5 组，每组 15 块。在腌制阶段，将质量分数 2% 的食盐、150 mg/kg 的亚硝酸钠及质量分数 0%、0.15%、0.30%、0.45% 和 0.75% ( $m/m$ ) 冷冻干燥后得到的生姜提取物混合均匀，均匀涂抹于肉块表面，于 4 °C、相对湿度 85%~95% 条件下腌制 2 d。腌制结束后将样品转移到恒温恒湿箱中进行风干成熟操作，其间温湿度程序为：起始温度 13 °C、环境湿度 85%，然后按照每天温度升高 1.5 °C、相对湿度每天降低 0.5% 进行风干成熟 12 d。以不添加生姜提取物为样品对照，每个工艺点 3 个重复。

在培根加工过程中的主要工艺点（原料、腌制后、风干 4 d、风干 8 d 和风干 12 d）随机抽取 3 块肉块，

然后将其切碎，将表面和内部肉块混匀即为样品，用不透光真空袋真空包装，-20 °C 条件下冻藏备用。

### 1.3.6 亚硝化影响

#### 1.3.6.1 亚硝酸盐含量的测定

按照 AOAC:1995<sup>[14]</sup> 方法进行。

#### 1.3.6.2 3-硝基酪氨酸含量的测定

参照 Feng 等<sup>[15]</sup>的方法，提取肌原纤维蛋白(MP)，用 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液（含 0.6 mol/L NaCl，pH 值 6.25）将 MP 蛋白膏稀释到 20 mg/mL。取处理好的肌原纤维蛋白溶液 100 μL，加入 0.36 mL 乙腈、0.04 mL 1 mol/L 的 NBD-F、0.5 mL 0.1 mol/L 四硼酸钠溶液，混匀在 60 °C 水浴 2 min。冷却后过 0.45 μm 滤膜，进液相色谱分析。色谱柱为 250 mm×4.6 mm，5 μm；流动相为磷酸氢钾-磷酸缓冲液/乙腈（20 mmol/L，pH 值 3.0），流速为 1.0 mL/min，上样量为 10 μL。

#### 1.3.6.3 *N*-二甲基亚硝胺含量的测定

准确称取切碎的样品 10.0 g 放入离心管中，加入 80 mL 重蒸二氯甲烷用高速分散机匀浆 30 s，匀浆后超声提取 15 min，经 10 g 无水硫酸钠过滤脱水后，收集二氯甲烷有机相。每个样品重复超声 3 次，合并二氯甲烷到平底烧瓶，在 50 °C 水浴下旋转蒸发浓缩至 5 mL 左右，再用氮吹仪浓缩近干，用色谱二氯甲烷定容至 1.0 mL，过 0.45 μm 微孔滤膜，上机测定<sup>[16]</sup>。

色谱柱为 HP-5MS 毛细管色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），升温程序：初始温度 50 °C，保持 2 min，以 8 °C/min 升至 150 °C，保持 5 min，然后以 20 °C/min 升至 250 °C，保持 2 min；载气流速为 1 mL/min；电子轰击 (EI) 离子源；电离电压 70 eV；电子倍增器电压 1301 eV；进样口温度为 230 °C，不分流进样；离子源温度为 230 °C；四极杆温度为 250 °C；测定采用 SIM/全扫描 (SCAN) 采集模式，扫描质量范围： $m/z$  30~150，溶剂延迟时间 2.5 min，进样量为 1 μL。采用外标法对 NDMA 定量计算，每次测定重复 3 次。

### 1.3.7 生姜提取物成分的鉴定

色谱条件：色谱柱 Waters XTerra MS C18（4.6×150 mm，5 μm），柱温 30 °C，样品是生姜提取物的甲醇溶液，上样体积为 10 μL，二极管阵列检测器（扫描波长 200~600 nm），洗脱流量为 0.4 mL/min。洗脱剂为乙腈 (A) 和水（含体积分数 0.2% 甲酸，B），采用梯度洗脱：0~5 min，3% A；5~30 min，3%~30% A；30~40 min，30%~95% A；40~45 min，95% A；45~48 min，95%~3% A；48~53 min，3% A。

质谱条件：离子源为电喷雾 (ESI) 负离子模式扫描，毛细管温度为 300 °C，喷雾电压为 4.5 kV，鞘气压力 300 kPa，辅助气压力 34 kPa。一级质谱采用高分

辨傅里叶 (FT) 全扫描采集, 扫描范围  $m/z$ : 50~1 200 ku, 分辨率为 60 000, 二级质谱采用二维线性离子阱 (LTQ) 采集, 采用碰撞诱导解离 (CID) 裂解, 碰撞能量为 35 eV。

#### 1.4 统计分析

采用 SAS 8.2 统计软件进行不同处理间单因素方差分析 (one-way ANOVA analysis), 指标测定均重复 3 次, 试验结果以均值±标准差表示; 当  $p < 0.05$  时, 表示均值间差异显著,  $p < 0.01$  时, 表示均值间差异极显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生姜提取物中总酚含量的测定

本课题前期研究测定了 32 种生姜提取物中总酚的含量, 结果显示永康黄姜的总酚含量最高<sup>[17]</sup>, 因此本研究选取永康黄姜为原料。经测定永康黄姜提取物的总酚含量是 66.46 mg/g, 在腌制阶段按照永康黄姜提取物 0.15% ( $m/m$ ) 添加量计算相当于 99.69 mg/kg 总酚, 0.30% 生姜提取物添加量相当于 199.38 mg/kg 总酚, 0.45% 提取物添加量相当于 299.07 mg/kg 总酚, 0.75% 生姜提取物添加量相当于 498.45 mg/kg 总酚含量。

### 2.2 生姜提取物的抗氧化能力分析

不同浓度生姜提取物对 ABTS<sup>+</sup> 和 DPPH 自由基的清除能力如图 1 所示。不同浓度的生姜提取物对 ABTS<sup>+</sup> 和 DPPH 自由基均具有较强的清除效果。在试验浓度范围内, 生姜提取物 DPPH 自由基的清除能力从 13.33% 增加到了 67.34%。当 DPPH 自由基的清除率达到 50% 时, 生姜提取物质量浓度为 0.79 mg/mL。ABTS 在氧化剂的作用下可以生成绿色的 ABTS<sup>+</sup> 自由基, 该自由基在 734 nm 下有最大吸收; 在抗氧化剂存在时, 会抑制 ABTS<sup>+</sup> 自由基的产生, 通过测定 734 nm 下自由基的吸光值变化来反映样品的抗氧化能力。生姜提取物质量浓度与自由基清除率成正相关, 随着样品质量浓度的增加, 对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除效能也不断增加。同等质量浓度下, 生姜提取物对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除作用较 DPPH 自由基清除作用强。在试验浓度范围内, 生姜提取物对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力从 16.00% 增加到了 72.67%。当 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率为 50% 时, 生姜提取物质量浓度为 0.63 mg/mL。

在这两种自由基清除体系中, ABTS<sup>+</sup> 和 DPPH 自由基的清除能力与姜酚含量呈极显著相关性 ( $p < 0.01$ ), 表明姜酚能够通过提供电子和氢, 直接消除自由基,

因此具有较好的抗氧化效果。Stoilova 等<sup>[9]</sup>研究了生姜提取物的抗氧化能力, 发现姜粉提取物中含有 870.10 mg/g 的酚类化合物, 对 DPPH 自由基的清除率达到 90.10%。Li 等<sup>[18]</sup>研究发现姜酚中脱氧姜酮和姜酮能有效清除 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基, 且 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率有一定相关性, 与本试验结果一致。

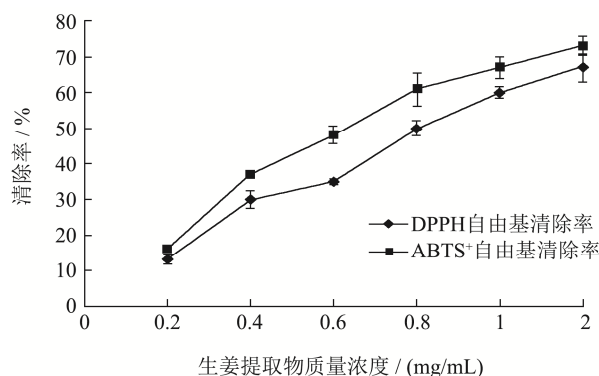


图 1 生姜提取物对 ABTS<sup>+</sup> 自由基和 DPPH 自由基清除率

Fig.1 ABTS<sup>+</sup> and DPPH free radical scavenging activity of ginger extracts

### 2.3 不同生姜提取物添加量对培根风干成熟过程中亚硝酸盐残留量的影响

表 1 为不同生姜提取物添加量对培根风干过程中亚硝酸盐残留量的影响。原料中亚硝酸盐含量最低, 各处理组样品腌制后亚硝酸盐残留量显著升高 ( $p < 0.05$ ), 0.75% 添加量处理组中亚硝酸盐为 67.84 mg/kg, 为所有处理组中最低。随着风干时间的延长, 各处理组样品中亚硝酸盐残留量都呈逐渐降低的趋势 ( $p < 0.05$ )。添加生姜提取物能显著降低 ( $p < 0.05$ ) 培根风干过程中亚硝酸盐含量, 风干结束时 0.45% 和 0.75% 添加量处理组的亚硝酸盐残留量分别为 17.00 mg/kg 和 15.91 mg/kg, 分别比对照组降低了 37.55% 和 41.55% ( $p < 0.05$ )。风干 4 d 开始, 随着生姜提取物添加量增加, 其对亚硝酸盐清除效果也逐渐增加。

Li 等<sup>[7]</sup>报道葡萄籽提取物和茶多酚能显著降低亚硝酸盐的残留量 ( $p < 0.05$ ), 亚硝酸盐的残留量可能与初始亚硝酸盐的水平及多酚含量有关, 且亚硝酸盐在发酵香肠中的动态变化趋势与本研究一致。陈冬丽等<sup>[19]</sup>研究发现南姜提取液对亚硝酸盐的清除率达 53.12%。Riel 等<sup>[20]</sup>报道西芹提取粉添加到香肠中对亚硝酸盐残留的影响, 与对照组相比可以使亚硝酸盐残留量显著降低 40%, 指出亚硝酸盐在多酚还原剂存在下显著影响其转化和降解速度。在培根风干成熟过程中亚硝酸盐残留量逐渐降低, 可能与微生物代谢产生的外源酶与肌肉中存在的内源酶有关<sup>[21]</sup>, 亚硝酸盐在

这些酶的作用下分解成 NO 和亚硝酸, 转变产物通过和内源物反应降低亚硝酸盐含量<sup>[22]</sup>。生姜提取物具有多个酚羟基, 还原力较强, 亚硝酸盐在酸性环境中转

化为不稳定的亚硝酸, 随后与酚羟基反应生成氮气, 达到显著降低风干培根中亚硝酸盐的含量<sup>[23]</sup>。

表 1 不同生姜提取物添加量对干腌培根加工过程中亚硝酸盐残留量的影响

Table 1 The residual nitrite contents during dry-cured processing of bacons treated with different levels of ginger extracts

生姜提取物(m/m) 添加量/%	亚硝酸钠残留量/(mg/kg)				
	原料	腌制后	风干 4 d	风干 8 d	风干 12 d
Control	1.69±0.21 <sup>dA</sup>	82.55±1.43 <sup>aA</sup>	69.45±0.59 <sup>bA</sup>	31.80±0.75 <sup>cA</sup>	27.22±0.48 <sup>cA</sup>
0.15	1.60±0.18 <sup>dA</sup>	78.69±0.91 <sup>aAB</sup>	63.70±0.74 <sup>bAB</sup>	28.64±1.10 <sup>cAB</sup>	22.18±1.40 <sup>cAB</sup>
0.30	1.66±0.15 <sup>eA</sup>	72.79±0.96 <sup>aAB</sup>	57.75±1.13 <sup>bBC</sup>	26.27±1.61 <sup>cABC</sup>	19.79±1.62 <sup>dAB</sup>
0.45	1.57±0.23 <sup>dA</sup>	73.79±2.96 <sup>aAB</sup>	53.86±0.18 <sup>bC</sup>	23.18±0.12 <sup>cBC</sup>	17.00±0.31 <sup>cB</sup>
0.75	1.72±0.08 <sup>dA</sup>	67.84±0.87 <sup>aB</sup>	41.42±1.88 <sup>bD</sup>	21.17±2.14 <sup>cC</sup>	15.91±1.10 <sup>cB</sup>

注: 同行小写字母不同者差异显著 ( $p < 0.05$ ); 同列大写字母不同者差异显著 ( $p < 0.05$ ) ( $n=3$ )。表 2 同。

表 2 不同生姜提取物添加量对干腌培根加工过程中 3-硝基酪氨酸的影响

Table 2 The 3-nitrotyrosine contents during dry-cured processing of bacons treated with different levels of ginger extracts

生姜提取物(m/m) 添加量/%	3-硝基酪氨酸/(nmol/mg)				
	原料	腌制后	风干 4 d	风干 8 d	风干 12 d
Control	2.01±0.15 <sup>dA</sup>	2.08±0.49 <sup>dA</sup>	12.90±0.18 <sup>cA</sup>	15.27±1.69 <sup>bA</sup>	16.72±0.04 <sup>aA</sup>
0.15	1.95±0.10 <sup>cA</sup>	2.05±0.05 <sup>cA</sup>	12.50±0.51 <sup>bA</sup>	15.18±1.36 <sup>aA</sup>	16.03±0.34 <sup>aAB</sup>
0.30	1.97±0.10 <sup>dA</sup>	2.02±0.20 <sup>dA</sup>	12.31±0.22 <sup>cA</sup>	14.49±0.56 <sup>bAB</sup>	15.89±0.46 <sup>aAB</sup>
0.45	1.93±0.08 <sup>dA</sup>	2.14±0.10 <sup>dA</sup>	11.27±2.07 <sup>cA</sup>	13.10±0.22 <sup>bB</sup>	15.29±0.03 <sup>aBC</sup>
0.75	1.94±0.12 <sup>cA</sup>	2.08±0.49 <sup>cA</sup>	10.67±2.15 <sup>bA</sup>	12.85±0.63 <sup>aB</sup>	14.76±1.04 <sup>aC</sup>

## 2.4 不同生姜提取物添加量对培根加工过程

### 中 3-硝基酪氨酸的影响

表 2 为不同生姜提取物添加量对培根加工过程中 3-硝基酪氨酸 (3-NT) 的影响。随着风干时间的延长, 各处理组 3-NT 含量都显著升高 ( $p < 0.05$ )。在风干过程中, 亚硝酸盐可以产生活性氮, 如 NO 能进一步与超氧化物自由基反应形成过氧硝酸盐, 过氧硝酸盐可以启动蛋白质的亚硝化作用, 产生 3-NT<sup>[15]</sup>。风干 12 d 对照组中 3-NT 含量最高为 16.72 nmol/mg, 当生姜提取物添加量为 0.45% 时, 显著抑制 3-NT 生成 ( $p < 0.05$ ), 比对照组降低了 8.55% ( $m/m$ )。本研究发现添加生姜提取物能显著降低蛋白亚硝基化水平, 这与 Villaverde 等<sup>[24]</sup>发现抗坏血酸可以有效降低肌原纤维蛋白 3-NT 的形成, 抑制亚硝基化进程结论一致。生姜提取物抑制亚硝基化作用可能与其对羟基自由基等活性物质的清除作用有关。

## 2.5 不同生姜提取物添加量对培根加工过程

### 中亚硝胺的影响

表 3 为不同生姜提取物添加量对培根加工过程中

亚硝胺的影响。原料和腌制后肉样中均无 *N*-二甲基亚硝胺 (NDMA) 检出, 对照组和生姜提取物添加组在风干 4 d 后 (0.15%、0.30%、0.45%、0.75%,  $m/m$ ) 开始有 *N*-二甲基亚硝胺检出, 此时对照组中 NDMA 含量最高为 0.54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 0.75% 添加量处理组为 0.39  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在整个风干成熟过程中, NDMA 含量在所有处理组中均随着加工时间显著增加 ( $p < 0.05$ ), 0.75% 添加量处理组 NDMA 检出量最低, 风干结束时达到最大值, 对照组、0.15%、0.30%、0.45% 和 0.75% 处理组 NDMA 含量分别达到了 1.03、0.97、0.83、0.70 和 0.65  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 其中 0.75% 添加量处理组比对照组降低了 36.89%, 而 0.75% 与 0.45% 添加量处理组间无显著差异 ( $p > 0.05$ )。

我国规定肉制品中 NDMA 最高检出不得超过 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 风干结束对照组中 NDMA 最大含量为 1.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 未超过国家规定的限量标准, 且 0.45% 和 0.75% 添加量能显著降低亚硝胺的含量 ( $p < 0.05$ )。加工过程中 NDMA 检出量的升高可能与培根风干成熟过程中微生物代谢及生物胺累积有关, 腌制阶段添加的亚硝酸盐与亚硝胺前体物-生物胺反应生成亚硝胺<sup>[25,26]</sup>。Xiao 等<sup>[27]</sup>在发酵香肠中接种戊糖乳杆菌对亚硝胺的影响, 研究发现通过降低亚硝胺的前体物质 (亚硝酸盐、生物胺) 可以抑制亚硝胺的生成。结合表 1

结果可知, 0.75%添加量能显著降低亚硝酸盐残留量 ( $p < 0.05$ ), 亚硝酸盐是亚硝胺的前体物质, 亚硝酸盐和肌肉中二级胺反应生成亚硝胺, 可能是导致0.75%生姜提取物处理组亚硝胺含量降低的原因。生

姜提取物具有酚羟基, 能与亚硝酸根进行氧化还原反应, 抑制亚硝基化试剂如  $\text{NO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}_3$ 、 $\text{ONOOH}$  生成<sup>[22]</sup>, 降低亚硝胺前体物浓度, 从而降低培根中亚硝胺的积累。

表 3 不同生姜提取物添加量对干腌培根加工过程中亚硝胺的影响

Table 3 NDMA content during dry-cured processing of bacons treated with different levels of ginger extracts

生姜提取物(m/m) 添加量/%	N-二甲基亚硝胺含量/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
	原料	腌制后	风干 4 d	风干 8 d	风干 12 d
Control	nd	nd	0.54±0.06 <sup>cA</sup>	0.65±0.06 <sup>bA</sup>	1.03±0.05 <sup>aA</sup>
0.15	nd	nd	0.50±0.05 <sup>cAB</sup>	0.62±0.02 <sup>bAB</sup>	0.97±0.06 <sup>aA</sup>
0.30	nd	nd	0.46±0.02 <sup>cBC</sup>	0.59±0.03 <sup>bB</sup>	0.83±0.02 <sup>aB</sup>
0.45	nd	nd	0.42±0.02 <sup>cC</sup>	0.49±0.03 <sup>bC</sup>	0.70±0.04 <sup>aC</sup>
0.75	nd	nd	0.39±0.05 <sup>bc</sup>	0.46±0.01 <sup>bc</sup>	0.65±0.09 <sup>aC</sup>

注: 同行小写字母不同者差异显著 ( $p < 0.05$ ); 同列大写字母不同者差异显著 ( $p < 0.05$ ) ( $n=3$ ); nd: 无检出。

表 4 生姜提取物 LC-LTQ Orbitrap MS/MS 鉴定结果

Table 4 Identification of ginger extract by LC-LTQ Orbitrap MS/MS

峰号	保留时间/min	母离子( $m/z$ )	误差/( $\times 10^{-6}$ )	分子式	鉴定物质	中文名称
1	25.24	279.160 2	3.395	$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_5$	Methoxy-4-gingerol	甲氧基-4-姜酚
2	25.97	193.087 0	5.589	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$	Zingerone	姜酮
3	27.28	367.118 7	2.956	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$	Curcumin	姜黄素
4	31.17	281.174 7	-0.127	$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_4$	Methyl-4-gingerol	甲基-4-姜酚
5	32.80	371.150 0	2.924	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$	Tetrahydrocurcumin	四氢姜黄素
6	34.42	337.108 1	3.114	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$	Demethoxycurcumin	去甲氧基姜黄素
7	35.43	295.191 5	3.774	$\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_4$	6-gingerdiol	6-姜二醇
8	37.72	289.144 5	3.681	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4$	1-dehydro-6-gingerdione	1-脱氢-6-姜二酮
9	38.70	291.160 2	3.827	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4$	6-dehydro-6-gingerol	6-脱氢-6-姜酚
10	40.90	265.144 5	4.014	$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_4$	4-gingerol	4-姜酚
11	43.10	275.165 3	4.103	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3$	6-shogaol	6-姜烯酚
12	46.21	293.175 8	3.630	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4$	6-gingerol	6-姜酚
13	48.35	321.207 1	3.313	$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_4$	8-gingerol	8-姜酚

## 2.6 生姜提取物的成分鉴定

为进一步确定生姜提取物对亚硝酸盐及亚硝胺抑制作用的物质基础, 本试验对生姜提取物的主要活性成分进行了鉴定。生姜提取物活性成分鉴定总离子流图见图 2。根据总离子流图 2 中的保留时间、质谱数据, 结合相关文献报道, 本试验从生姜提取物中共检测鉴定出 13 种主要成分(见表 4)。生姜提取物具有抗肿瘤、降低胆固醇和抗炎症等作用<sup>[28,29]</sup>, 本研究表明生姜提取物还能有效清除  $\text{ABTS}^+$  和  $\text{DPPH}$  自由基。生姜提取物中富含酚羟基, 羟基上的活泼氢能捕捉自由基, 从而阻断自由基链式反应<sup>[30,31]</sup>,  $\text{H}^+$  消耗亚硝酸根, 进而降低亚硝胺累积。由鉴定结果得知生姜提取物中大多是姜酚类物质, 包括姜酮、姜黄素、6-姜烯酚、6-姜酚、8-姜酚、4-姜酚、四氢姜黄素和去甲

氧基姜黄素等, 说明姜酚类物质有潜在的清除亚硝酸盐及降低亚硝胺累积的能力, 是有效抑制亚硝胺累积的天然提取物。

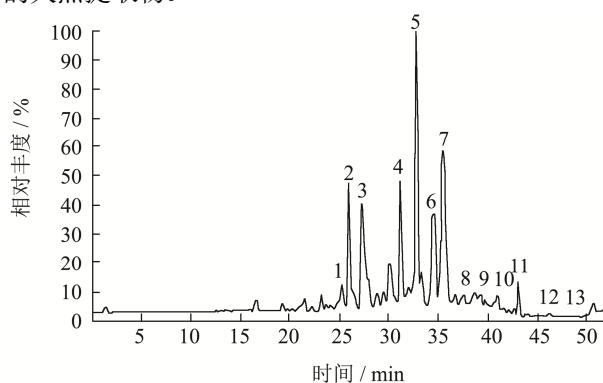


图 2 生姜提取物总离子流图

Fig.2 The total ion chromatogram of ginger extract



### 3 结论

亚硝胺的致癌性、致畸和致突变性与氧化损伤有密切联系,酚类物质因其具有较强的抗氧化活性,其酚类结构能清除生物体内羟基自由基和超氧自由基。生姜提取物能显著清除 ABTS<sup>+</sup>和 DPPH 自由基 ( $p<0.05$ ),风干结束时,0.75%生姜提取物添加量处理组中亚硝酸盐残留量、3-NT 和 NDMA 含量分别比对照组降低了 41.55%、11.72%和 36.89% ( $p<0.05$ )。研究结果表明生姜提取物能清除亚硝酸盐残留,显著降低 3-硝基酪氨酸和亚硝胺的累积。最后采用 LC-LTQ Orbitrap MS/MS 技术从永康黄姜提取物中共鉴定到 13 种成分,大多是姜酚类物质,分别是甲氧基-4-姜酚、姜酮、姜黄素、甲基-4-姜酚、四氢姜黄素、去甲氧基姜黄素、6-姜二醇、1-脱氢-6-姜二酮、6-脱氢-6-姜酚、4-姜酚、6-姜烯酚、6-姜酚和 8-姜酚,研究结果将为开发以生姜为原料的功能食品降低发酵肉制品中有毒有害物质提供技术参考。

### 参考文献

- [1] Pomélie D, Santé-Lhoutellier V, Sayd T, et al. Oxidation and nitrosation of meat proteins under gastro-intestinal conditions: Consequences in terms of nutritional and health values of meat [J]. Food Chemistry, 2018, 243: 295-304
- [2] Crews C. The determination of *N*-nitrosamines in food [J]. Quality Assurance and Safety of Crops and Foods, 2010, 2(1): 2-12
- [3] Crews C. Processing contaminants: *N*-nitrosamines [J]. Encyclopedia of Food Safety, 2014, 2(3): 409-415
- [4] Karre L, Lopez K, Getty K J K. Natural antioxidants in meat and poultry products [J]. Meat Science, 2013, 94(2): 220-227
- [5] Bozkurt H. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage [J]. Meat Science, 2006, 73(3): 442-450
- [6] Wang Y L, Li F, Zhuang H, et al. Effects of plant polyphenols and  $\alpha$ -tocopherol on lipid oxidation, residual nitrites, biogenic amines, and *N*-nitrosamines formation during ripening and storage of dry-cured bacon [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 60(1): 199-206
- [7] Li L, Shao J H, Zhu X D, et al. Effect of plant polyphenols and ascorbic acid on lipid oxidation, residual nitrite and *N*-nitrosamines formation in dry-cured sausage [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2013, 48(6): 1157-1164
- [8] Lorenzo J M, Pateiro M, Domínguez R, et al. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review [J]. Food Research International, 2017, 106: 1095-1104
- [9] Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, et al. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*) [J]. Food Chemistry, 2007, 102(3): 764-770
- [10] 王永丽,李锋,乔维维,等.姜辣素对培根风干成熟过程中微生物及生物胺形成的抑制效应[J].食品科学,2015,36(3):29-34
- [10] WANG Yongli, LI Feng, QIAO Weiwei, et al. Inhibition of microorganism and biogenic amines formation in dry-cured bacons by gingerol [J]. Food Science, 2015, 36(3): 29-34
- [11] Magalhães L M, Santos F, Segundo M A, et al. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of folin-ciocalteu reducing capacity [J]. Talanta, 2010, 83(2): 441-447
- [12] Robert R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biological and Medicine, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [13] Yang L C, Li R, Tan J, et al. Polyphenolic composition of the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. grown in Hebei China and their radical scavenging activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(8): 1772-1778
- [14] AOAC. Official methods of analysis of AOAC international, 16th edn [S]. Association of Official Analytical Chemists, 1995
- [15] Feng X C, Li C Y, Ullah N, et al. Potential biomarker of myofibrillar protein oxidation in raw and cooked ham: 3-nitrotyrosine formed by nitrosation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(51): 10957-10964
- [16] Sannino A, Bolzoni L. GC/CI-MS/MS method for the identification and quantification of volatile *N*-nitrosamines in meat products [J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3925-3930
- [17] 刘步云,王永丽,张健,等.不同品种生姜的抗氧化及抗炎活性[J].食品与发酵工业,2015,41(11):81-86
- [17] LIU Buyun, WANG Yongli, ZHANG Jian, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activity of different gingers [J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(11): 81-86
- [18] Li F, Nitteranon V, Tang X, et al. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of 1-dehydro-[6]-gingerdione, 6-shogaol, 6-dehydroshogaol and hexahydrocurcumin [J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 332-337
- [19] 陈冬丽,黄俊生.南姜清除亚硝酸盐及阻断亚硝胺合成的研究[J].中国调味品,2010,35(5):59-61

- CHEN Dongli, HUANG Junsheng. Study on scavenging nitrite and disconnecting nitrosamine synthesis with south ginger extracts [J]. China Condiment, 2010, 35(5): 59-61
- [20] Riel G, Boulaaba A, Popp J, et al. Effects of parsley extract powder as an alternative for the direct addition of sodium nitrite in the production of mortadella-type sausages-Impact on microbiological, physicochemical and sensory aspects [J]. Meat Science, 2017, 131: 166-175
- [21] Eveline D M, Klerck K, Maere H, et al. The occurrence of *N*-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation [J]. Meat Science, 2014, 96(2): 821-828
- [22] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, et al. Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella [J]. Meat Science, 2010, 85(3): 568-576
- [23] Pegg R B, Shahidi F. Nitrite Curing of Meat: The *N*-Nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives [M]. John Wiley & Sons, 2008
- [24] Villaverde A, Parra V, Estévez M. Oxidative and nitrosative stress induced in myofibrillar proteins by a hydroxyl-radical-generating system: Impact of nitrite and ascorbate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(10): 2158-2164
- [25] Drabik-Markiewicz G, Dejaegher B, Mey E D, et al. Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of *N*-nitrosamine in heated cured pork meat [J]. Food Chemistry, 2011, 126(4): 1539-1545
- [26] Honikel K O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products [J]. Meat Science, 2008, 78(1): 68-76
- [27] Xiao Y Q, Li P J, Zhou Y, et al. Effect of inoculating *Lactobacillus pentosus* R3 on *N*-nitrosamines and bacterial communities in dry fermented sausages [J]. Food Control, 2018, 87: 126-134
- [28] Noshirvani N, Ghanbarzadeh B, Gardrat C, et al. Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70: 36-45
- [29] Marx W, Ried K, Mccarthy A L, et al. Ginger-mechanism of action in chemotherapy-induced nausea and vomiting: A review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(1): 141-146
- [30] Vipin A V, Raksha Rao K, Nawneet Kumar Kurrey, et al. Protective effects of phenolics rich extract of ginger against aflatoxin B1-induced oxidative stress and hepatotoxicity [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 91: 415-424
- [31] Abolaji A O, Ojo M, Afolabi T T, et al. Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from *Zingiber officinale* (ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats [J]. Chemico-Biological Interactions, 2017, 270: 15-23