不同加热方法对牛肉酶解蛋白与葡萄糖反应活性的影响

吴 肖[1]，孔令会[1]，于立梅[2]
(1.广东汇香源生物科技股份有限公司，广东 广州 510663；2.仲恺农业工程学院轻工食品学院，广东 广州 510225)

摘 要：目的：探讨不同加热方法(微波、高压、热空气流、水蒸气)下牛肉酶解蛋白与葡萄糖之间的反应活性。方法：以精制新鲜牛肉为基料，采用分子质量分布分析法和感官品评分析法。结果：在不同加热方法处理中，牛肉酶解蛋白类物质活性发生变化的方式不同，主要是降解作用、分解作用和聚合作用，而Maillard反应作用方式不太显著，体现牛肉风味物质分布于1000～4999D区间，主要集中于3000～4999D之间，结论：在3000～4999D这个区间的牛肉风味物质烤香不明显，主要体现良好的牛肉本味和浓厚的口感。

关键词：牛肉；加热方法；反应活性；风味

Different Heating Methods for the Reactivity between Beef Enzymatic Protein and Glucose

WU Xiao[1]，KONG Ling-hui[1]， YU Li-mei[2]
(1. Guangdong H-BIO Biotech Co. Ltd., Guangzhou 510663, China；
2. College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract：Objective: To investigate the effect of different heating methods (microwave, high pressure, the flow of hot air, water vapor) on reactivity between beef enzymatic protein and glucose. Methods: refined fresh beef as the base material, the molecular weight distribution analysis and sensory evaluation analysis were applied. Results: the activities of beef enzymatic protein changed in various ways among different treatment of heating methods, mainly including degradation, decomposition and polymerization reactions. But the Maillard reaction was not significant. The beef flavor substances were distributed between 1000 D and 4999 D, mainly in the range of 3000—4999 D. Conclusion: The beef flavor substances in the range of 3000—4999D were not significant in the roasted flavor, but showed good beef flavor and strong taste.

Key words：beef；heating method；reactivity；flavor
中图分类号：TS255.36 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)09-0033-04
doi:10.7506/spkx1002-6630-201309008

动物蛋白是形成丰满圆润醇厚口感的重要物质之一[1]。当动物蛋白酶解后经过不同能量方式作用，其风味形成和释放机理存在差异[2-5]，在这个过程中参与的主要反应为蛋白质、肽和氨基酸的分解和降解作用以及Maillard反应，因而对不同加热方法中蛋白类物质反应活性以及风味物质形成和释放规律研究具有重要意义。牛肉风味是肉类风味研究中最为广泛和深入的一种，主要集中的领域为：牛肉风味主要贡献活性香气化合物以及结构研究[6]、12-甲基十三醛浓度对动物生长发育的影响[7]、煮制牛肉肉质特性与芳香成分的影响[8]、煮制牛肉芳香成分、新噻唑类化合物等的鉴定[9-11]、存在煮制牛肉中的硫化合物的分离和鉴定[12]、烤制牛肉中芳香成分的鉴定[13]、肉制品加工和模拟肉味风味研究[14-15]，而对于牛肉呈味物质的研究较少。牛肉蛋白质经酶解后形成一定分子质量分布的蛋白质、肽和氨基酸，通过加入葡萄糖进行Maillard热反应后形成牛肉风味类芳香物质。但是不同蛋白质、肽和氨基酸与葡萄糖的反应活性不同，而且未反应的酶解物和形成的牛肉风味物质呈味性能不同，相对于世界范围内牛肉蛋白风味物质在不同反应体系中消长规律的研究，我国的研究起步较晚，我国源远流长的食文化对风味物质的研究提出迫切的需求。本实验以四川甘孜州的新鲜牦牛肉作为原料，经过相同的酶解工艺，分别运用不同的加热方法(微波、高压、热空气流、水蒸气)和葡萄糖反应一段时间，对其产物进行风味物质的释放规律的分析研究，为牛肉类风味物质的进一步研究提供参考。

收稿日期：2013-03-18
基金项目：“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD23B01)
作者简介：吴肖(1975—)，女，高级工程师，博士，研究方向为食品生物技术及食品化学。E-mail：xiaowu2013@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛肉，四川甘孜州牦牛肉。

复合蛋白酶、风味蛋白酶 诺和诺德酶制剂公司；葡萄糖 广州泽明科技发展有限公司。

1.2 仪器与设备

JJ1000型电子天平 常熟市双杰测试仪器厂；LZB-4WB型玻璃转子流量计 宁波市科奥流量仪表有限公司；JB90-D电动搅拌器 上海标本模型厂；ZCY-15A型恒温油浴锅 宁波天恒仪器厂；空气净化滤膜 上海名列化工科技有限公司；S-608型增氧泵 中山市日胜电器制品有限公司；高效液相色谱装置 美国Waters公司；自制微波反应装置、自制高压反应釜。

1.3 实验工艺

牛肉与水的质量比为1:1，预先搅碎称其总质量，加入牛肉蛋白质总质量0.5%的复合蛋白酶和风味蛋白酶，在(55±1)℃的条件下酶解2h，然后再加入与牛肉蛋白质总质量相同量的葡萄糖，分别放入不同的热反应体系中进行反应，然后进行感官品评，选择牛肉风味和香气较好的一组进行图谱分析。

1.4 实验体系

1.4.1 体系1-微波热反应体系

将上述反应原料放入装有电动搅拌器的自制微波反应设备中，设定温度为(100±1)℃，待温度上升至指定温度时，开始计时，分别选取10、15、20、25、30min停止反应，迅速冷却至常温，称其质量，保持质量恒定，低温保存。所得样品进行感官品评，选出牛肉香味得分最高一组，用高效液相色谱测定其分子质量分布曲线图。

1.4.2 体系2-高压热反应体系

将上述反应原料放入自制的高压反应釜中，设定压力为1.5kgf，待压力上升至指定压力时开始计时，分别选取30、50、70、90、110min停止反应，迅速冷却至常温，称其质量，保持质量恒定，低温保存。所得样品进行感官品评，选出牛肉香味得分最高一组，用高效液相色谱测定其分子质量分布曲线图。

1.4.3 体系3-热空气流热反应体系

将上述反应原料放入自制气升式反应器中，设定温度为(100±1)℃，通入预处理热空气并计时，分别选取30、50、70、90、110min停止反应，迅速冷却至常温，称其质量，保持质量恒定，低温保存。所得样品进行感官品评，选出牛肉香味得分最高一组，用高效液相色谱测定其分子质量分布曲线图。

1.4.4 体系4-水蒸气热反应体系

将上述反应原料放入水蒸气发生器中，设定温度为(100±1)℃，并开始计时，分别选取30、50、70、90、110min停止反应，迅速冷却至常温，称其质量，保持质量恒定，低温保存。所得样品进行感官品评，选出牛肉香味得分最高一组，用高效液相色谱测定其分子质量分布曲线图。

1.5 分析方法

采用高效液相色谱分析柱对牛肉制备液的分子组成种类分子质量分布及含量进行测定，分析条件：柱温38℃，C_{18}色谱柱：40mm×125mm，流动相：V(甲醇):V(乙腈)=1:2；检测器：UV波长338nm；流速：1mL/min，检测波长：254nm。根据标准蛋白质的出峰保留时间，峰面积和分子质量首先确定分子质量拟合曲线，然后根据拟合曲线，通过保留时间计算所测各蛋白质的分子质量及相对含量，这种计算程序已经输入高效液相色谱分析程序，所以蛋白质分子质量分布及相对含量的结果直接输出。

1.6 感官品评设计

感官测评后选中的每个样品制作3次，混匀过胶体磨，然后对每一个样品采用3位数字进行随机编码，每一组包括3个样品，每一个样品在50℃恒温水浴锅中恒温一段时间，然后冲成体积分数1%，倒入一次性浅口塑料杯，在闻香室由嗅闻小组成员打分，每一个样品被不同的成员嗅闻3次(包括品尝)，根据得分取其平均值。得分采用60分制，即最高为60分，最低为0分，每10分为一个级别。感官嗅闻之后取得分在30及以上分之间的单因素范围条件进行高效液相测定分子质量分布分析。其中嗅闻小组成员是由经过专门训练的调香师或者反应工程师组成，总共13人。

2 结果与分析

2.1 酶解牛肉色谱图

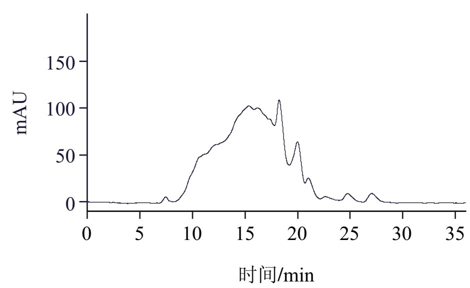

图1 酶解牛肉蛋白色谱图

Fig.1 Chromatogram of beef enzymatic protein

由图1可知，牛肉经过一段时间酶解后，大于10000D的蛋白类物质占0.29%(小于10.88min)，5000～9999D(10.88～16.09min)的蛋白类物质占73.21%，3000～4999D(16.09～19.93min)的蛋白类物质占12.92%，1000～2999D(19.93～28.18min)的蛋白类物质占13.58%，

小于999D(大于28.19min)的蛋白类物质没有，说明该牛肉经过酶解之后，牛肉蛋白的立体空间结构已经被破坏，2～10个分子的寡肽几乎不存在，主要以多肽和寡聚肽的形式存在。

2.2　微波热反应体系色谱图

表 1　微波热反应体系感官品评结果

Table 1　Results of sensory analysis in microwave system

时间/min	10	15	20	25	30
得分	48	53	50	47	30
主体风味	炖煮牛肉风味，稍有烤味	炖煮牛肉风味增强，烤味较前明显	烤味增加，稍微有烤过头牛肉风味	烤味过重，有碳烧风味	带有烤焦牛肉风味，已经部分碳化

由表1可知，15min时所得牛肉风味较协调，有牛肉本味，烤味稍有增强，并无碳化和焦糊等不愉快风味，因而选取该样品进行色谱分析，所得谱图如图2所示。

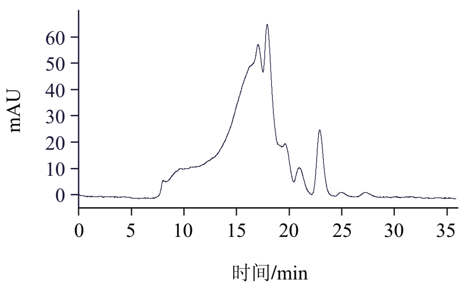

图 2　牛肉酶解液在微波体系中分子质量分布色谱图

Fig.2　Molecular weight distribution chromatogram of beef enzymatic protein in microwave system

由图2可知，牛肉酶解液在微波体系中反应后，大于10000D的蛋白类物质占6.45%，5000～9999D的蛋白类物质占2.97%，3000～4999D的蛋白类物质占81.98%，1000～2999D的蛋白类物质占8.43%，小于999D的蛋白类物质没有。在该体系中，大于10000D的牛肉蛋白类物质含量升高，说明5000～9999D区间物质部分发生聚合作用。而3000～4999D的牛肉蛋白类物质明显升高，5000～9999D区间物质发生强烈降解和分解作用。1000～2999D区间物质降低，说明部分发生聚合作用和Maillard反应，降解和分裂作用并不明显。体现良好牛肉风味物质分布在1000～4999D之间，主要集中于3000～4999D区间。在酸水解和酶解的植物蛋白中，国外也有相关牛肉风味研究[16-17]，但是两者明显的区别在于反应底物差异性较大，所得牛肉风味的逼真性区别也很明显。

2.3　高压热反应体系色谱图

表 2　高压热反应体系感官品评结果

Table 2　Results of sensory analysis in high pressure system

时间/min	30	50	70	90	110
得分	37	42	56	51	43
主体风味	牛腥味较重，牛肉味不足	牛腥味降低，熟牛肉风味增强	熟牛肉本味，整体肉味饱满协调	熟牛肉本味，稍带有生锈味	生锈味增强，烤味出现，整体不协调

由表2可知，70min时所得牛肉风味较协调，有熟牛肉本味，整体肉味饱满协调，没有碳化、焦糊、锈金属和热反应的酸气等不愉快风味，因而选取该样品进行色谱分析。

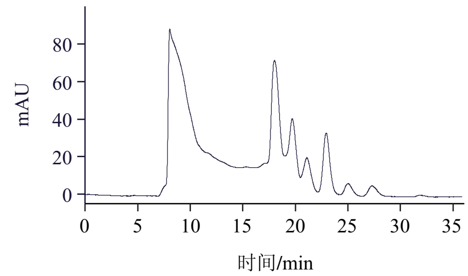

图 3　牛肉酶解液在高压热反应体系中反应后的分子质量分布图谱

Fig.3　Molecular weight distribution chromatogram of beef enzymatic protein in high pressure system

由图3可知，肉酶解液在高压热反应体系中反应后大于10000D的蛋白类物质占60.87%，5000～9999D的蛋白类物质和小于999D的蛋白类物质没有，3000～4999D的蛋白类物质占27.95%，1000～2999D的蛋白类物质占11.18%，在该体系中大于10000D的牛肉蛋白类物质明显高于酶解牛肉，说明在该体系中聚合作用明显增强，尤其是5000～9999D的多肽聚合作用强烈，部分该区间的牛肉酶解蛋白物质发生降解作用。该样品烤香不明显，主要体现纯牛肉香气和口感，说明该体系Maillard反应趋势不明显。

2.4　热空气流热反应体系色谱图

表 3　热空气流热反应体系感官品评结果

Table 3　Results of sensory analysis in the flow of hot air system

时间/min	30	50	70	90	110
得分	36	42	55	48	39
主体风味	牛腥味和生腥味较重，牛肉味不足	牛腥味和生腥味降低，有熟牛肉风味	有干蒸牛肉干本味，稍有烤味，整体肉味饱满协调	牛肉干风味降低，稍带有热反应的酸气，烤味增强	牛肉干风味明显降低，反应酸气明显增强，整体不协调

由表3可知，70min时所得牛肉风味饱满协调，有干蒸牛肉干本味，稍有烤味，没有碳化和焦糊等不愉快风味，因而选取该样品进行色谱分析。

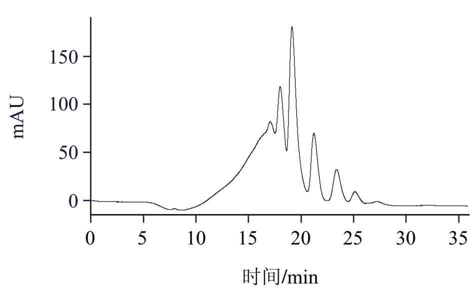

图 4　牛肉酶解液在热空气流体系中反应后的分子质量分布图谱

Fig.4　Molecular weight distribution chromatogram of beef enzymatic protein in the flow of hot air system

由图4可知，牛肉酶解液在热空气流体系中反应后，大于5000D和小于999D的蛋白类物质为0，3000～4999D的蛋白类物质占85.52%，1000～2999D的蛋白类物质占14.48%，说明在该体系中，分子质量大于5000D的牛肉酶解蛋白类物质主要发生降解和分解作用，而分子质量小于999D的牛肉酶解蛋白类物质的聚合作用似乎也不明显。与葡萄糖的反应活性主要集中于1000～4999D的牛肉酶解蛋白类物质中，但是Maillard反应趋势明显弱于降解和分解作用。体现牛肉香气和醇厚牛肉口感的活性物质主要分布于1000～4999D区间，主要集中于3000～4999D。该样品稍微具有烤味。

2.5 水蒸气热反应体系色谱图

表 4 水蒸气热反应体系感官品评结果

Table 4 Results of sensory analysis in water vapor system

时间/min	30	50	70	90	110
得分	42	56	51	45	37
主体风味	牛腥味较重，熟牛肉味不足	稍有牛腥味，熟牛肉风味饱满，无明显生腥味和烤味，牛肉风味突出	熟牛肉本味，稍有锈金属风味	熟牛肉本味，锈金属味增强	牛肉本味明显降低，锈金属味和酸气明显增强，整体不协调

由表4可知，50min时所得牛肉风味突出而且协调饱满，没有生腥味，也无其他不愉快风味，因而选取该样品进行色谱分析。

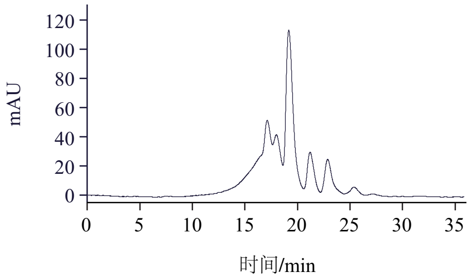

图 5 牛肉酶解液在水蒸气热反应体系中反应后的分子质量分布图谱

Fig.5 Polymerization of tyrosine and ferulaic acid catalysis by POD

由图5可知，牛肉酶解液在水蒸气热反应体系中反应后，大于10000D和小于999D的蛋白类物质为0，5000～9999D的蛋白类物质占0.48%，3000～4999D的蛋白类物质占80.67%，1000～2999D的蛋白类物质占18.85%，在该体系中牛肉风味物质的消长规律接近于热空气流能量场体系，主要作用方式是5000～9999D区间物质发生强烈降解和分解作用。3000～4999D区间物质降解和分解作用也比较显著，因而1000～2999D区间的物质含量增高。Maillard反应在整个区间都不明显。体现良好牛肉风味物质主要分布在1000～4999D。

3 结 论

经过一定程度水解的牛肉蛋白质，分子质量分布主要在5000～9999D的寡肽和多肽形式存在的牛肉蛋白质，运用不同加热方式，与葡萄糖进行热反应的活性存在差异，因而形成的牛肉风味也存在差异。不同热处理方法的热反应体系中，牛肉酶解蛋白类物质发生变化的方式不同，主要是降解和分解作用、聚合作用，而Maillard反应作用方式不太显著，这可能与分子质量大小和分子反应活性有关。体现牛肉风味物质分布于1000～4999D区间，主要集中于3000～4999D之间。在这个区间的牛肉酶解液与葡萄糖在高压，热空气流和水蒸气热处理方式作用下形成的牛肉风味物质烤香不明显，主要体现良好的牛肉味，无其他不良风味。

参考文献：

[1] SCHREIER P, WINTERHALTER P. Progress in flavor precursor studies[M]. Weston, USA: Allured Publishing, 1993.
[2] MOTTRAM D S. Thermally generated flavors[M]. Washington DC: American Chemical Society, 1995: 105-126.
[3] ETIEVANT P X. Artifacts and contaminants in the analysis of food flavor[J]. CRC Crit Rev Food Sci Nutri, 1996, 36: 733-745.
[4] REINECCIUS G. Biases in analytical flavor profiles introduced by isolation method[M]// HO C T, MANLEY C H. Flavor measurement. New York: Marcel Dekker, 1993: 61-76.
[5] GROSCH W. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis[J]. Trends Food Sci Technol, 1993, 4: 68-73.
[6] KERSCHER R, GROSCH W. Comparative evaluation of potent odorants of boiled beef by aroma extract dilution and concentration analysis[J]. Zeitschrft Fur Lebensmitt, 1997, 204: 3-6.
[7] GUTH H, GROSCH W. Development of the 12-methyltridecanal concentration in beef on the age of the animal[J]. Z Lebensm Unters Forsch, 1995, 201: 25-26.
[8] MACLEOD G, AMES J M. 2-Methyl-3(methyl-thio) furan: a meaty character impact aroma compound identified from cooked beef[J]. Chem Ind London, 1986, 25: 175-176.
[9] GASSER U, GROSCH W. Identification of volatile flavor compounds with high aroma values from cooked beef[J]. Z Lebensm Unters Forsch, 1998, 186: 489-494.
[10] HARTMAN G J, JIN Q Z, COLLINS G J, et al. Nitrogen-containing heter-acyclic compounds identified in the volatile flavor constitutes of roast beef[J]. J Agric Food Chem, 1983, 31: 1030-1033.
[11] ELMORE J S, MOTTRAM D S, ENSER M B, et al. Novel thiazoles and 3-thiazolines in cooked beef aroma[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 3603-3607.
[12] WILSON R A, MASSINAN C J, KATZ I, et al. Isolation and identification of some sulfur chemicals present in pressure-cooked beef [J]. J Agric Food Chem, 1973, 21: 873-876.
[13] MIN D B, INA K, PETERS R J, et al. Preliminary identification of volatile flavor compounds in the neutral fraction of roasted beef[J]. Journal of Food Science, 1979, 44: 639-642.
[14] VARAVINIT S, SHOBSNGOB S, BHIDYACHAKORAWAT M, et al. Production of meat-like flavor[J]. Science Asia, 2000, 26: 219-224.
[15] MACELOD G, SEYYEDAIN-ARDEBILI M. Natural and simulated meat flavors (with particular reference to beef)[J]. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1981, 14: 309-437.
[16] AASLYNG M D, ELMORE J S, MOTTRAM D S. Comparison of the aroma characteristics of acid-hydrolyzed and enzyme-hydrolyzed vegetable proteins produced from soy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 46: 5225-5231.
[17] BAEK H H, KIM C J, AHN B H, et al. Aroma extract dilution analysis of a beef-like process flavor from extruded enzyme-hydrolyzed soybean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 790-793.