

米酒乳杆菌对风鸭肌肉蛋白质降解的影响*

许慧卿, 蒋云升, 王畏畏, 汪志君, 董 杰

(扬州大学旅游烹饪(食品科学)学院, 江苏扬州, 225001)

摘 要 以米酒乳杆菌(*Lactobacillus sake*)为发酵剂加工风鸭,研究其在风鸭加工过程中对肌肉蛋白降解的影响。用 SDS-PAGE 电泳分析蛋白质的降解规律,同时比较加工初期及末期游离氨基酸的变化,并以不接菌样品为对照。结果表明,与对照样相比,米酒乳杆菌促进了肌浆蛋白与肌原纤维蛋白的降解,显著增加了游离氨基酸的总量;产鲜氨基酸、苦味氨基酸的总量和比例均显著增加;必须氨基酸总量显著增加,比例未发生显著变化;甜味氨基酸的总量未发生显著变化,比例显著下降。总之,米酒乳杆菌是一种优良的发酶剂。

关键词 米酒乳杆菌, 风鸭, 蛋白质降解, 游离氨基酸

风鸭是我国传统的腌腊肉制品,四川、江苏、浙江、安徽等地均有生产。产品鲜香酥嫩,风味独特,深受广大消费者喜爱。但传统的风鸭制品存在生产周期长,质量不稳定等缺点,限制了产品的进一步发展。运用现代微生物技术分离菌种并制备人工肉品发酵剂,实现对腌腊肉制品发酵过程的人工调控,不但能缩短风鸭的加工周期,而且对其风味的形成与营养价值的提高也起到促进作用。在众多微生物发酵剂中,乳酸菌发酵碳水化合物产生大量的乳酸,引起发酵肉制品的 pH 值降低和良好质构的形成,同时也使产品具有独特的风味^[1,2]。

国内外大量研究表明,腌腊肉制品的风味形成主要是由蛋白质、脂类物质经多种因素的共同作用产生的。其中蛋白质降解产生的小肽和游离氨基酸不仅是火腿中的重要滋味物质,而且它们参与的后继化学反应产生的香味物质往往是腌腊肉制品的特征风味物质^[3-5]。本文主要研究米酒乳杆菌(*Lactobacillus sake*)在风鸭加工过程中对肌肉蛋白降解的影响,目的在于探讨乳酸菌发酵剂在发酵型风鸭加工过程中的作用,这将为发酵剂的选择和发酵风鸭品质的控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

米酒乳杆菌(*L. sake*),实验室保存。

1.1.2 原 料

樱桃谷鸭,由徐州龙飞地食品有限公司提供

1.1.3 培养基

MRS 培养基, pH 调至 5.5 左右。

1.1.4 试 剂

电泳所用试剂为电泳级,染色剂为生化级,其它试剂均为分析纯;中分子量蛋白质 Marker 及宽分子量蛋白质 Marker,由大连宝生物有限公司提供。

1.1.5 设 备

高速冷冻离心机,电泳仪,日立氨基酸自动分析仪,凯氏定氮仪,生化培养箱,超净工作台,高速均质仪,磁力搅拌器,高压灭菌锅。

1.2 方 法

1.2.1 发酵风鸭的制作

将米酒乳杆菌在 MRS 液体培养基中活化 3 次,接于 MRS 斜面培养至对数生长期,用无菌生理盐水洗下,调节菌密度至 1×10^8 cfu/mL 左右,用肌肉注射与表面涂抹相结合的方法接菌至鸭肉,接种量为 2.5%。将接菌的鸭子放入 32℃ 的生化培养箱发酵。分别取 0 h, 12 h, 24 h, 48 h 的鸭肉作为样品,以不接菌,并加入适量抗菌素的鸭肉作为对照。

1.2.2 肌肉蛋白的降解研究^[6]

肌浆蛋白的提取:取鸭肉 10 g,充分粉碎后按质量体积比(W/V) 1:10 加入 0.03 mol/L。

pH6.5 的磷酸缓冲液,4℃ 下用磁力搅拌器匀浆 4 min,同温度下 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液 4℃ 透析过夜,即为肌浆蛋白。

肌原纤维蛋白的提取:取鸭肉 10g,充分粉碎后按质量体积比(W/V) 1:10 加入 0.03 mol/L, pH6.5 的磷酸盐缓冲液,4℃ 下用磁力搅拌器匀浆 4 min,同温度下 10 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,再按质量体积比(W/V) 1:10 加入 0.03 mol/L 的

第一作者:硕士研究生(汪志君为通讯作者)。

* 江苏省“十一五”农业科技攻关项目(BE2006324)

收稿日期:2007-07-26

磷酸缓冲液,4℃下磁力搅拌器上匀浆4 min,同温度下10 000 r/min离心20 min。重复上述操作3次,然后按质量体积比(W/V)1:4加入0.1 mol/L, pH6.5(含0.7 mol/L KI和0.02% NaN₃)的磷酸盐缓冲液,4℃下用磁力搅拌器匀浆4 min,同温度下10 000 r/min离心20 min,取上清液4℃透析过夜,即为肌原纤维蛋白。

用考马斯亮蓝法^[7]测定蛋白质浓度,以牛血清白蛋白作标准曲线。

SDS-PAGE不连续凝胶电泳:参照汪家政与郭君尧的方法^[8,9],浓缩胶为4%,分离胶为10%。上样前将样品浓度调至1 mg/mL,然后与5×样品缓冲液(含60 mmol/L Tris,2% SDS,14.4 mmol/L 巯基乙醇、25%甘油,用4 mol/L HCl调pH至6.8,加入0.1%溴酚蓝)按体积比4:1混合。上样前样品煮沸10 min,Marker煮沸5 min。上样量为10 μL。

电泳:起始电压80V,样品进入分离胶后加大电压至150V,待溴酚蓝到达距底线1.5 cm左右时,停止电泳。

染色:加入考马斯亮蓝R-250染色液[V(甲醇):V(冰醋酸):V(水)=45:10:45,并加入0.2%考马斯亮蓝R-250],混和染色40 min。

脱色:加脱色液[V(甲醇):V(冰醋酸):V(水)=5:5:40],用清水清洗凝胶,于脱色摇床上反复多次脱色至脱色液无色、蛋白带清晰可辨,条带比较标准蛋白分子量来鉴别。

1.2.3 游离氨基酸的测定^[10]

取1 g干燥样品,加入8%的磺基水杨酸10 mL,高速均质机均质后,4℃下10 000 r/min离心20 min,取上清液过滤,同温度下20 000 r/min离心15 min,取上清液上机检测。

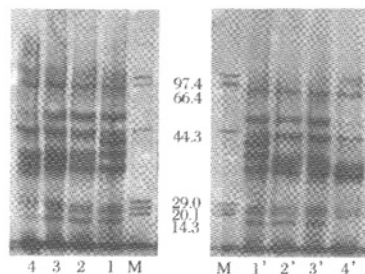
2 结果与分析

2.1 肌浆蛋白的降解趋势

鸭肉肌浆蛋白与肌原纤维蛋白的SDS-PAGE不连续凝胶电泳图谱如图1和图2所示。

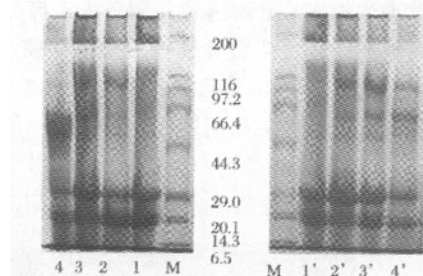
由图1所示,在风鸭加工过程中,处理组与CK肌浆蛋白均发生了不同程度的降解。加工12 h,66.4 ku左右的蛋白质片段发生降解;加工24 h,66.4~44.3 ku的蛋白质片段发生降解,生成44.3 ku,20.1 ku,14.3 ku的小分子量蛋白质片段;至48 h,44.3 ku,20.1 ku,14.3 ku的小分子量蛋白质片段发生了显著降解,生成分子量更小的蛋白质片段或

氨基酸。与CK相比,用米酒乳杆菌发酵的风鸭肌浆蛋白的降解规律在0~48 h内无明显的差别,但米酒乳杆菌发酵的风鸭肌浆蛋白的降解速度显然要更快一些。



1—CK 0 h, 2—CK 12 h, 3—CK 24 h, 4—CK 48 h, 1'—米酒乳杆菌发酵0 h, 2'—米酒乳杆菌发酵12 h, 3'—米酒乳杆菌发酵24 h, 4'—米酒乳杆菌发酵48 h, M—中分子量蛋白质Marker

图1 鸭肉肌浆蛋白电泳图



1—CK 0 h, 2—CK 12 h, 3—CK 24 h, 4—CK 48 h, 1'—米酒乳杆菌发酵0 h, 2'—米酒乳杆菌发酵12 h, 3'—米酒乳杆菌发酵24 h, 4'—米酒乳杆菌发酵48 h, M—宽分子量蛋白质Marker

图2 鸭肉肌原纤维蛋白电泳图

由图2所示,处理组与CK肌原纤维蛋白在0~48 h内发生的显著的降解。加工12 h,2处理中由大分子蛋白质降解形成大量的97.2,66.4 ku左右的蛋白质片段;24 h,这种分解进一步加剧,生成的量也越来越多。至48 h,CK组大于97.2 ku的蛋白质片段几乎完全降解,形成大量66.4~44.3 ku的蛋白质片段;CK组29.0 ku的蛋白质片段从12~48 h过程中有一个减少—增加—减少的过程;用米酒乳杆菌发酵的样品48 h,97.2 ku左右的蛋白质片段也发生了降解,但降解程度明显小于CK,66.4 ku左右的蛋白质片段明显增加;29.0 ku,14.3 ku的蛋白质片段发生了明显的降解,20.1 ku左右的蛋白质片段几乎完全降解。

2.2 游离氨基酸的变化

游离氨基酸的变化如表1所示。

表 1 不同处理中游离氨基酸的含量 mg/100g(湿基)

氨基酸	发酵 0 h	CK 48 h	乳酸菌发酵 48 h
Asp	16.47±1.97 ^c	28.97±2.07 ^{ab}	61.03±1.59 ^a
Thr	21.67±1.60 ^{bb}	22.53±1.50 ^{bb}	31.50±1.18 ^a
Ser	3.93±0.81 ^a	4.03±0.32 ^a	2.77±0.31 ^{bb}
Glu	74.70±3.57 ^c	94.83±3.53 ^{bb}	154.10±18.17 ^a
Gly	24.13±0.31 ^c	28.87±4.73 ^{bb}	32.00±0.72 ^a
Ala	57.80±4.45 ^c	81.50±1.35 ^a	63.60±4.62 ^{bb}
Cys	27.57±1.27 ^{cb}	32.07±0.71 ^a	28.97±2.23 ^{bb}
Val	21.80±0.89 ^c	43.97±1.81 ^{bb}	54.63±3.07 ^a
Met	14.33±1.48 ^c	27.43±0.561 ^{bb}	29.07±2.71 ^a
Ile	13.53±0.35 ^c	34.33±2.22 ^{bb}	44.77±1.84 ^a
Leu	32.63±2.24 ^c	67.60±3.13 ^{bb}	86.47±8.50 ^a
Tyr	22.20±0.61 ^a	12.53±1.24 ^c	15.07±1.26 ^{bb}
Phe	18.20±3.38 ^c	40.93±0.25 ^{bb}	53.97±5.10 ^a
Lys	37.77±2.30 ^c	43.97±2.32 ^{bb}	59.29±5.34 ^a
His	36.97±1.16 ^a	17.19±6.85 ^c	23.78±2.27 ^{bb}
Arg	0	0	0
Total	423.70±17.10 ^c	580.77±27.56 ^{bb}	741.03±45.01 ^a

注:同行小写字母表示 $P < 0.05$ 水平的差异显著性;大写字母表示 $P < 0.01$ 水平的差异显著性。

由表 1 可知,在风鸭加工 48 h 后,2 个处理的氨

基酸总量增加极显著,CK 48 h 后是 0 h 的 1.37 倍,米酒乳杆菌处理 48 h 后是 0 h 的 1.75 倍,是 CK 的 1.27 倍,这是由于前者只是鸭肉的组织蛋白酶分解蛋白质生成氨基酸,后者微生物及其产物对蛋白质的分解和氨基酸的形成也起到了显著的作用。在风鸭加工过程中,各种游离氨基酸的含量随着加工进程都有不同程度的变化。CK 经 48 h 后,丝氨酸与苏氨酸与 0 h 相比未发生显著变化,酪氨酸与组氨酸显著减少,其它氨基酸均显著增加。接入米酒乳杆菌的处理经 48 h 发酵后,所有种类的氨基酸与 0 h 相比均发生显著变化,其中丝氨酸、酪氨酸与组氨酸显著减少,其它氨基酸均显著增加。与 CK 比较来看,接入米酒乳杆菌的处理丝氨酸、丙氨酸和半胱氨酸的含量显著减少,其它的氨基酸均显著增加。不同处理中各种氨基酸的增减可能与微生物酶与肉组织酶对氨基酸的酶解作用及各种氨基酸的降解、氧化分解生成小分子物质有关^[11]。

表 2 不同处理中不同类型氨基酸的含量 mg/100g(湿基)

	发酵 0 h	CK 发酵 48 h	乳酸菌发酵 48 h
必须氨基酸含量/mg · (100g) ⁻¹	196.9±8.75 ^c	297.97±16.07 ^{bb}	383.5±23.82 ^a
占氨基酸总量的百分数/%	46.47±0.19 ^{bb}	51.29±0.32 ^a	51.75±0.70 ^a
产鲜氨基酸/mg · (100g) ⁻¹	91.07±5.45 ^{cb}	123.8±5.21 ^{ba}	215.13±17.77 ^a
占氨基酸总量的百分数/%	21.48±0.59 ^{bb}	21.32±0.04 ^{bb}	29.03±0.68 ^a
甜味氨基酸/mg · (100g) ⁻¹	28.06±1.01 ^{ba}	32.9±5.04 ^a	34.77±0.81 ^a
占氨基酸总量的百分数/%	6.61±0.09 ^a	5.65±0.62 ^{ba}	4.69±0.28 ^{cb}
苦味氨基酸/mg · (100g) ⁻¹	104.83±2.94 ^c	163.87±9.39 ^{bb}	206.23±12.89 ^a
占氨基酸总量的百分数/%	24.75±0.40 ^{bb}	28.21±0.44 ^a	27.83±0.22 ^a

注:同行小写字母表示 $P < 0.05$ 水平的差异显著性;大写字母表示 $P < 0.01$ 水平的差异显著性。

由表 2 可知,加工 48 h 后,2 种处理类型的氨基酸的含量发生了显著的变化。与 0 h 相比,CK 的必须氨基酸(Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys、His)、产鲜氨基酸(Asp、Glu)、甜味氨基酸(Ser、Gly)和苦味氨基酸(Val、Met、Ile、Phe)^[12]的含量均显著增加,必须氨基酸和苦味氨基酸占氨基酸总量的百分比也显著增加,而产鲜氨基酸的百分含量略有减少,甜味氨基酸的百分比显著减少。米酒乳杆菌处理的必须氨基酸、产鲜氨基酸、甜味氨基酸和苦味氨基酸的含量与 0 h、CK48 h 后相比均发生了显著的增加;必须氨基酸、苦味氨基酸的百分含量比 0 h 显著增加,与 CK 相比无显著变化;产鲜氨基酸的百分含量比 0 h 和 CK 均显著增加,而甜味氨基酸却显著下降。由此可知,与 CK 相比,加入米酒乳杆菌发酵后,显著增加了产品的鲜味,而营养价值几乎没有变化,风味有所改

变。

3 讨论

米酒乳杆菌是一种同型发酵的乳酸菌。用米酒乳杆菌用为作为发酵剂可促进风鸭加工过程中肌肉蛋白的降解。米酒乳杆菌促进肌肉蛋白的降解可能有两种途径,一是通过降低 pH,激活肌肉本身组织蛋白酶的活性,把肌肉蛋白分解在多肽。因为动物细胞中存在大量的内源组织蛋白酶,有学者认为组织蛋白酶(尤其是 D)在发酵开始阶段是主要的蛋白水解剂,它在 pH 约 5.0 下被激活,水解肌球蛋白和肌动蛋白产生肽^[13]。而乳酸菌能通过 EMP 途径利用碳水化合物产生乳酸,把肉制品的 pH 迅速降低到 5.0 左右。其次,同样有研究发现,乳酸菌细胞壁连接的蛋白酶对肌原纤维及肌浆蛋白均有一定程度的分解

作用^[14]。尽管乳酸菌对蛋白质的分解能力不强,但是由于其在发酵香肠整个发酵、成熟过程中一直保持着较高浓度^[15],其在蛋白质分解方面所起的作用是不可忽视的。

同样,用米酒乳杆菌作为发酵剂可增加氨基酸的含量及改变氨基酸的组成。近年来已有研究证明,米酒乳杆菌能分泌肽酶和氨肽酶,把肽进一步分解成氨基酸。微生物酶还能分解多种氨基酸成小分子的挥发性物质,增加产品的风味^[16]。本实验中氨基酸总量增加及不同氨基酸的增加或减少符合这一观点。但苦味氨基酸含量过高时,会影响产品的风味。

米酒乳杆菌是一种优良的微生物发酵剂。但是,发酵肉制品风味的形成是由肌肉内源酶及多种微生物共同作用的结果,具有极其复杂的风味,所以进一步研究开发包括乳酸菌在内的复合发酵剂还是非常必要的。

参 考 文 献

- 1 Hammes W, Bantleon A, Min S. Lactic acid bacteria in meat fermentation[J]. FEMS Microbiol Rev, 1990, 87:165~174
- 2 Montel M C, Masson F, Talon R. Bacterial role in flavour development [J]. Meat Science, 1998, 49 (suppl.): 111~123
- 3 Naes H, Holck A L, Axelsson L, et al. Accelerated ripening of dry fermented sausage by addition of a *Lactobacillus* proteinase[J]. International Journal of Food Science and Technology, 1995, 29:651~659
- 4 Ventanas J, Cordoba J, Antequera T, et al. Hydrolysis and Maillard reaction during ripening of Iberian ham[J]. Journal of Food Science, 1992, 57(4):813~815
- 5 竺尚武,杨耀寰. 金华火腿口味及呈味物质的研究[J]. 食品科学, 1993, (3):8~11
- 6 Molina L, F Toldra. Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham [J]. Food Sci, 1992, 61:1 308~1 310
- 7 张龙翔,张庭芳,孔令媛. 生物化学实验方法和技术(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社, 1997. 136~137
- 8 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2001. 77~110
- 9 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社, 2001. 86
- 10 沈清武. 发酵干香肠成熟过程中的菌相变化及发酵剂对产品质量的影响[D]. 中国农业大学, 2004
- 11 Van Jaarsveld F P, Naude R J. Effect of Chemical and Physical Dry-curing Parameters on Cathepsins B, H and L from Ostrich muscle[J]. Meat Science, 1998, 50(2): 223~233
- 12 张亚军. 金华火腿蛋白降解酶与其品质的关系[D]. 浙江大学, 2004
- 13 Hagen B, Berdague J. Proteinase reduces maturation time of dry fermented sausages [J]. Food Sci, 1996, 61 (5):1 024~1 029
- 14 Toldra F, Miralles M, Flores J. Protein extractability in dry-cured ham[J]. Food Chem, 1992, 44: 391~394
- 15 Esoda M, Said H. Cell-wall associated peptinases in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Protection, 1986, 49(5):361~365
- 16 Molly K, Demeyer D, Johansson G, et al. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages, First results of an European project[J]. Food Chem, 1997, 59:539~545

Effects of *Lactobacillus sake* on Proteolysis of Dry-Salted Duck

Xu Huiqing, Jiang Yunsheng, Wang Weiwei, Wang Zhijun, Dong Jie

(Yangzhou University Tour and Cuisine(Food Science) College, Yangzhou 225001, China)

ABSTRACT Effects of *Lactobacillus sake* on proteolysis during processing of dry-salted duck were studied without bacterial such as CK. SDS-PAGE was used to analyze proteolysis of dry-salted duck samples at different processing phases and the free-amino acid (FAA) were tested. The results showed that compared with CK, the levels of proteolysis were accelerated and contents of FAA were increased significantly by *L. sake*. The results showed that contents and rates of FAA with relish and the bitter FAA increased significantly than CK; contents of essential amino acid increased significantly than CK, but rates of essential amino acid had no significant difference; contents of FAA with sweet had no significant difference than CK, and rates of sweet FAA decreased significantly. In conclusion, *L. sake* was one kind of excellent starter culture.

Key words *Lactobacillus sake*, dry-salted duck, proteolysis, FAA