

烹饪温度对牦牛肉蛋白质氧化和体外消化特性的影响

张燕¹, 李升升^{1,2,*}, 赵立柱¹, 张强龙¹

(1.青海大学畜牧兽医科学院, 青海 西宁 810000; 2.国家牦牛肉加工专业技术研发中心, 青海 西宁 810000)

摘要: 将牦牛肉烹饪至不同中心温度(40、50、60、70、80 °C)后, 对其肌原纤维蛋白进行模拟体外胃肠消化实验, 并测定其肌原纤维蛋白的消化率以及消化前后的总羰基含量、总巯基含量、Schiff碱含量等指标, 还利用紫外吸收光谱、内源荧光光谱以及十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析蛋白样品, 探究牦牛肉蛋白质在胃肠消化过程中的氧化及消化规律。经胃、肠消化后, 中心温度为60 °C的牦牛肉总蛋白酶水解率最高(88.64%)。与原料肉相比, 中心温度为80 °C的牦牛肉蛋白质胃蛋白酶水解率和总蛋白酶水解率分别降低了34.10%和22.47%, 胰蛋白酶水解率提高了75.34%; 其经胃、肠消化后的总羰基含量与原料肉相比分别升高了81.42%和77.40%, 总巯基含量分别降低了30.02%和36.43%。随着中心温度升高, Schiff碱含量逐渐增大, 紫外吸收光谱的吸光度显著增强, 内源荧光光谱的荧光强度显著降低, SDS-PAGE图谱显示经消化后蛋白质发生严重降解至条带消失。结果表明: 中心温度为60 °C时牦牛肉的消化率最高, 80 °C时牦牛肉的蛋白质氧化程度最强, 在胃肠消化过程中进一步加剧。

关键词: 牦牛肉; 烹饪温度; 蛋白质氧化; 消化性

Effect of Cooking Temperature on Protein Oxidation and *in Vitro* Digestive Properties of Yak Meat

ZHANG Yan¹, LI Shengsheng^{1,2,*}, ZHAO Lizhu¹, ZHANG Qianglong¹

(1. Academy of Animal and Veterinary Sciences, Qinghai University, Xining 810000, China;

2. National Yak Meat Processing Technology Research and Development Professional Center, Xining 810000, China)

Abstract: The digestibility of myofibrillar proteins (MP) extracted from yak meat cooked to different internal temperatures of (40, 50, 60, 70 and 80 °C) was determined during *in vitro* gastrointestinal digestion, and total carbonyl content, total sulfhydryl content and Schiff base content before and after digestion were measured. Ultraviolet (UV) absorption spectroscopy, endogenous fluorescence spectroscopy and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were used to investigate the oxidation and digestion patterns of yak meat proteins during gastrointestinal digestion. The results showed that total protease hydrolysis of MP from yak meat cooked to 60 °C was the highest after simulated gastric and intestinal digestion (88.64%). The rates of pepsin hydrolysis and total protease hydrolysis of MP from yak meat cooked to 80 °C decreased by 34.10% and 22.47%, respectively, and the rate of trypsin hydrolysis increased by 75.34% compared with MP from raw yak meat. The total carbonyl content after simulated gastric and intestinal digestion increased by 81.42% and 77.40%, respectively, and the total sulfhydryl content decreased by 30.02% and 36.43%, respectively, compared with raw MP. With an increase in cooking temperature, the Schiff base content gradually increased, the UV absorbance was significantly enhanced, and the endogenous fluorescence intensity was significantly reduced. The SDS-PAGE patterns showed that the protein bands were severely degraded and even disappeared after digestion. It was found that the digestibility of MP from yak meat cooked to 60 °C was the highest. The degree of protein oxidation in yak meat cooked to 80 °C was the strongest and increased during gastrointestinal digestion.

Keywords: yak meat; cooking temperature; protein oxidation; digestibility

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230430-293

中图分类号: TS251.5+2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)02-0009-08

收稿日期: 2023-04-30

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项(2022YFD1602301)

第一作者简介: 张燕(1998—)(ORCID: 0000-0002-2439-0758), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与安全。

E-mail: 1043817835@qq.com

*通信作者简介: 李升升(1984—)(ORCID: 0000-0002-1957-8609), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为动物性食品科学与工程。E-mail: lishsh123@163.com

引文格式:

张燕, 李升升, 赵立柱, 等. 烹饪温度对牦牛肉蛋白质氧化和体外消化特性的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 9-16. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230430-293. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Yan, LI Shengsheng, ZHAO Lizhu, et al. Effect of cooking temperature on protein oxidation and *in vitro* digestive properties of yak meat[J]. Food Science, 2024, 45(2): 9-16. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230430-293. <http://www.spkx.net.cn>

牦牛 (*Bos gruniens*) 是分布于中国青藏高原及其沿线的特有畜种^[1], 能较好地适应高寒、低氧及牧草缺乏的地区。目前, 全球约有1 600万头牦牛, 95%以上的牦牛分布在国内的青海、西藏、甘肃、四川、云南、新疆等地^[2]。牦牛肉为高原人提供所需的必需氨基酸、脂肪酸、维生素和矿物质等^[3-4], 而且青藏高原地区的人们将牦牛肉作为动物蛋白的主要来源。由于牦牛肉脂肪含量较低, 蛋白质含量较高, 深受消费者的欢迎^[5]。

肉类在烹饪过程中, 高温加热虽然能消灭有害微生物, 保证肉类食用的安全性, 但同时也会生成活性氧等自由基, 进而攻击蛋白质分子, 促使氧化的发生^[6]。因此, 肉制品的蛋白质在加工过程中很容易发生氧化, 导致其结构发生变化, 对其功能特性产生一定影响^[7]。许多研究表明肉制品的烹饪会加剧蛋白质氧化的程度, 而蛋白质氧化程度在消化过程中会进一步加重^[8]。在人体消化过程中, 蛋白质氧化产物也会因消化液中的促氧化剂 (pH值、抗坏血酸、铁离子等) 而不断发生氧化^[9]。目前, 直接研究肉类蛋白质在人体内的消化代谢很困难, 所以主要通过体外模拟胃肠道消化实验进行研究^[10]。一些学者通过对肉类蛋白进行模拟胃肠道消化实验后发现, 肉制品经过烤制^[11]、煮制、蒸制、高压^[12]以及真空烹饪^[13]等加工后其肌肉蛋白更容易被消化吸收, 显著提高了蛋白质的消化率。但Li Li等^[14]对100 °C炖煮的猪肉进行体外模拟消化后发现, 与原料肉相比, 其消化率降低。此外, 在消化过程中蛋白质氧化主要表现为蛋白变性和蛋白水解, 会导致蛋白质结构完整性的改变。有学者发现在70 °C甚至更高的温度条件下烹饪猪肉, 会增加猪肉蛋白的胃蛋白酶水解能力, 在长时间的消化过程中, 热处理提高了蛋白质的降解能力^[15]。综上所述, 肉制品的加工条件会显著影响肉制品蛋白的消化性以及消化过程中肉蛋白的生物利用率。

目前, 关于牦牛肉制品在胃肠道消化过程中的消化性以及蛋白质氧化的研究较少, 为此, 本实验通过模拟体外胃肠道消化, 研究烹饪牦牛肉至不同中心温度后其肌原纤维蛋白 (myofibrillar protein, MP) 氧化程度及消化性的变化, 旨在为牦牛肉的精深加工和新产品研发技术提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

牦牛肉购自青海夏华清真肉类食品有限公司。挑选6头 (36±6) 月龄的生长发育良好、体况相近的牦牛, 宰后采集背最长肌, 在 (3±1) °C运回实验室, 待用。

牛血清白蛋白 美国Sigma公司; 胃蛋白酶 (牛源, 酶活力≥3 000 NFU/mg)、胰蛋白酶 (牛源, 酶活力≥2 500 U/mg) 上海源叶生物科技有限公司; 三氯乙酸、2-硫代巴比妥酸、2,4-二硝基苯肼 (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH)、十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfonate, SDS)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB)、乙二胺四乙酸、乙二醇四乙酸 (ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA)、尿素、硫酸亚铁、碘酸钠、无水乙醇、KHPO₄、KCl、KH₂PO₄、KOH、MgCl₂、甲醇、氯仿、冰醋酸 北京索莱宝科技有限公司; 所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

电磁炉 美的集团; 家用煮锅 浙江苏泊尔股份有限公司; 平底锅 宁波方太厨具有限公司; FSH-II型高速电动匀浆机 江苏金坛市振兴仪器厂; 电热恒温振荡水浴锅 上海一恒科技有限公司; UV-2550紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; Cary Eclipse荧光分光光度计 美国安捷伦公司; DYCZ-24DN型电泳槽、DYY-6C型电泳仪 北京六一生物科技有限公司; 2500R凝胶成像仪 上海天能科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 牦牛肉加工

将背最长肌表面的筋、腱、膜及脂肪剔除, 切成6 cm×6 cm×1.5 cm大小的肉样。平底锅中加油20 mL, 在226~228 °C条件下煎制, 每30 s翻面1次, 肉样连接K型热电偶探头数显温度计进行中心温度测定, 直至肉样中心温度分别为40、50、60、70、80 °C时立即取出, 吸干表面油渍后冷却至室温并称质量, 除去表皮放入液氮中速冻待后续分析^[16]。原料肉作为对照组, 所有处理组肉样一式3份。

1.3.2 MP提取

参考布鑫荣等^[17]的方法并略作修改。将3.0 g肉样放

入8倍体积磷酸钾缓冲液(20 mmol/L)中,并在由KCl(0.1 mol/L)、EGTA(2 mmol/L)和MgCl₂(2 mmol/L)配制而成的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH 6.8)中混匀,1 000×g冷冻离心10 min后保留沉淀,以上操作重复3次。用8倍体积100 mmol/L的KCl溶液将沉淀溶解,1 000×g冷冻离心10 min后继续保留沉淀,以上操作重复2次,即得MP,供后续实验使用。采用双缩脲法测定蛋白质量浓度,以牛血清白蛋白为标准品绘制标准曲线, x 为蛋白质量浓度, y 为吸光度,牛血清白蛋白的标准曲线方程为 $y=0.476 6x-0.005 3$ ($R^2=0.994$)。

1.3.3 体外模拟胃肠消化

参考Yin Yantao等^[18]的方法,略作修改。用甘氨酸缓冲液(33 mmol/L, pH 1.8)将MP溶液的质量浓度稀释至4 mg/mL,将2份制备好的样品分别与胃蛋白酶(5 U/mg)按照体积比1:3混合均质,一份在37℃连续振荡孵育90 min模拟胃消化,定量沉淀物质量(m_1 , mg)。剩余的一份用甘氨酸缓冲液(33 mmol/L, pH 8.0)稀释,按照体积比3:1的比例与胰蛋白酶(6.6 U/mg)混合均质,在37℃连续振荡孵育1 h模拟肠消化,定量沉淀物质量(m_2 , mg)。

1.3.4 蛋白质水解率测定

将上述1.3.3节中的 m_1 和 m_2 代入式(1)~(3)分别计算胃蛋白酶和胰蛋白酶对蛋白质的水解率及总水解率。

$$\text{胃蛋白酶水解率}/\% = \frac{12-m_1}{12} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{胰蛋白酶水解率}/\% = \frac{m_1-m_2}{12} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{总水解率}/\% = \frac{12-m_2}{12} \times 100 \quad (3)$$

1.3.5 总羰基含量测定

参考韦婕妤^[19]的方法并稍作修改。用100 mmol/L KCl溶液将MP溶液质量浓度调整为5 mg/mL,取2份0.5 mL蛋白液,一份加2 mL含体积分数为0.2% DNPH的2 mol/L HCl溶液,另一份加2 mL 2 mol/L HCl溶液作为对照,室温避光反应1 h(每10 min涡旋振荡1次)。分别添加2 mL体积分数为20%三氯乙酸溶液沉淀蛋白,离心(8 000×g, 5 min)。沉淀用2 mL乙酸乙酯-乙醇(体积比1:1)清洗,重复3次。分别加3 mL 20 mmol/L PBS(含6 mol/L盐酸胍, pH 6.5)后置于37℃水浴中保温30 min溶解沉淀,离心(8 000×g, 5 min)取上清液,在370 nm波长处测其吸光度。按式(4)计算羰基含量:

$$C_{\text{羰基}}/(\text{nmol/mg}) = \frac{3\,000\,000 \times A_1}{0.5 \times \varepsilon_1 \times \rho} \quad (4)$$

式中: A_1 为370 nm波长处吸光度; ρ 为蛋白质质量浓度/(mg/mL); ε_1 为摩尔消光系数(22 000 mol/(L·cm))。

1.3.6 总巯基含量测定

参考万红兵等^[20]的方法并稍作修改。用25 mmol/L磷酸钾缓冲液(pH 6.25)调整蛋白质量浓度为2 mg/mL。取0.5 mL依次加入2 mL尿素-SDS溶液(含8.0 mol/L尿素、30 g/L SDS、0.1 mol/L磷酸钾缓冲液, pH 7.4)和0.5 mL 10 mmol/L DTNB试剂(含0.1 mol/L磷酸钾缓冲液, pH 7.4),室温静置反应15 min,取上清液在412 nm波长处测定其吸光度,25 mmol/L磷酸钾缓冲液代替蛋白液用于空白对照。按式(5)计算总巯基含量:

$$C_{\text{总巯基}}/(\text{nmol/mg}) = \frac{3\,000\,000 \times A_2}{0.5 \times \varepsilon_2 \times \rho} \quad (5)$$

式中: A_2 为412 nm波长处吸光度; ρ 为蛋白质质量浓度/(mg/mL); ε_2 为摩尔消光系数(13 600 mol/(L·cm))。

1.3.7 Schiff碱含量测定

Schiff碱含量的测定参照Gatellier等^[21]的方法。按照蛋白液(1 mg/mL):PBS(20 mmol/L)=1 mL:20 mL混匀后取上清液进行测定,激发波长为350 nm,激发和发射狭缝为10 nm,待测范围为400~500 nm;所有样品重复测定3次。

1.3.8 紫外吸收光谱测定

参考张海璐等^[22]的方法并稍作修改。将MP用10 mmol/L PBS稀释至1 mg/mL后离心7 000×g,取上清液倒入比色皿中并置于紫外-可见分光光度计测定,扫描波长范围为240~350 nm,扫描速率快速,采样间隔为2 nm。

1.3.9 内源荧光光谱测定

参考郑云芳等^[23]的方法并稍作修改。用0.6 mol/L PBS将MP溶液质量浓度调整为0.5 mg/mL, PBS作对照组,采用荧光分光光度计进行测定,激发波长设定为295 nm,发射光谱范围为300~400 nm。

1.3.10 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)测定

将各蛋白质样品与上样缓冲液以体积比3:1比例混合,沸水加热5 min。制样完毕后,在质量分数为5%的浓缩胶和质量分数为15%的分离胶组成的电泳系统中,每孔加入10 μL样品,在120 V条件下进行电泳操作,结束后取下胶片,用考马斯亮蓝R-250染色1.5 h。用混合溶液(甲醇:乙酸:水=45:10:45, V/V)进行脱色。最后用凝胶成像系统对胶片进行拍照^[20]。

1.4 数据分析

采用SPSS Statistics 26软件对数据进行单因素方差分析,各组间差异用Duncan多重比较法,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用Origin 2021软件绘图;所有统计分析的显著水平均为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 牦牛肉蛋白质消化率变化

如表1所示,采用胃蛋白酶对蛋白质的水解率模拟胃消化率,胰蛋白酶对蛋白质的水解率模拟肠消化率。与原料肉相比,经加工后牦牛肉的胃蛋白酶水解率和总蛋白酶水解率均显著降低($P<0.05$),胰蛋白酶水解率显著升高($P<0.05$)。随着中心温度的升高,胃蛋白酶对MP的水解率呈先升高后降低的趋势,60℃时胃蛋白酶水解率最高达74.89%。胰蛋白酶水解率随着中心温度的升高呈先上升后降低的趋势,70℃时水解率最大,为23.37%。总蛋白水解率随着中心温度的升高先增大后减小,在60℃时水解率最大(88.64%)。相较于原料肉,80℃时胃蛋白酶水解率和总蛋白酶水解率分别降低了34.10%和22.47%,胰蛋白酶水解率提高了75.34%。总蛋白水解率与胃蛋白酶水解率变化趋势一致,可见蛋白质的消化性主要取决于胃蛋白酶水解作用。

表1 不同中心温度下经胃肠消化前后MP消化率变化

Table 1 Changes in gastrointestinal digestibility of MP from yak meat cooked to different internal temperatures

中心温度/℃	胃蛋白酶水解率/%	胰蛋白酶水解率/%	总蛋白水解率/%
原料肉	87.19±1.42 ^{ab}	3.09±2.60 ^c	90.28±4.17 ^b
40	73.89±5.26 ^a	13.17±4.81 ^b	87.07±1.93 ^a
50	70.63±2.33 ^a	14.86±4.10 ^b	85.49±2.10 ^a
60	74.89±3.59 ^a	13.75±4.23 ^b	88.64±1.82 ^a
70	61.66±5.89 ^{bc}	23.37±5.91 ^a	85.03±1.73 ^a
80	57.46±4.50 ^c	12.53±3.52 ^b	69.99±3.89 ^b

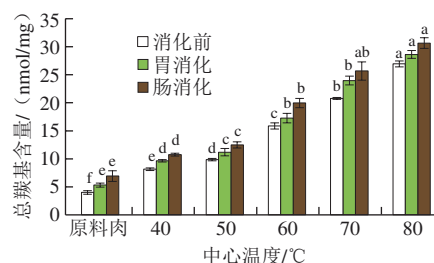
注:同列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

上述研究结果表明,蛋白质经加工后,在胃肠消化过程中水解率降低,可能是因为加工可以诱导与肌肉蛋白质氧化相关的修饰,从而通过影响胃蛋白酶的水解位点来降低其消化率^[24]。此外,胃蛋白酶在早期对蛋白质的水解作用较弱时,胰蛋白酶的降解作用会增强,这与Santé-Lhoutellier等^[25]的研究结果类似。

2.2 牦牛肉总羰基含量变化

蛋白羰基产物可通过直接氧化产生或者与脂肪氧化产物发生加成作用形成^[26],其含量是测定蛋白氧化程度的重要指标之一,反映了蛋白质被氧化破坏的程度。一般来说,羰基含量越高,蛋白氧化程度越大^[27]。如图1所示,牦牛肉蛋白质经胃肠消化前后的总羰基含量均随中心温度的升高显著增大($P<0.05$),且高于原料肉。与原料肉相比,80℃时消化前的蛋白质总羰基含量增大了85.16%,经胃消化后蛋白质的总羰基含量增大了81.42%,经肠消化后的总羰基含量增大了77.40%。在相同中心温度下,肠消化后的总羰基含量高于胃消化后的,消化前的总羰基含量最低。80℃牦牛肉蛋白质在肠

消化后的总羰基含量是胃消化后的1.07倍,是消化前的1.14倍。上述结果表明,MP经过胃肠道消化后总羰基含量显著升高($P<0.05$),表明消化道的氧化酶和其他促氧化剂进一步促进了蛋白质羰基化,这与Van Hecke等^[28]的研究结果一致。不同烹饪温度导致蛋白质氧化程度的高低决定了其对肉类消化性的影响。在煎制加工下,肉中的蛋白暴露于油脂中,所以脂质氧化促进了蛋白质氧化引起的羰基含量增加^[29]。



小写字母不同表示在同一消化阶段的不同温度样品间差异显著($P<0.05$),图2同。

图1 不同中心温度下经消化前后牦牛肉蛋白质总羰基含量变化

Fig. 1 Changes in total carbonyl content of MP from yak meat cooked to different internal temperatures before and after digestion

2.3 牦牛肉蛋白质总巯基含量的变化

MP在氧化过程中其巯基容易转变成二硫键,导致巯基含量降低,所以巯基含量也是表示蛋白氧化程度的重要指标之一,巯基含量越低代表蛋白质氧化程度越高^[30]。如图2所示,随着中心温度的升高,牦牛肉MP经胃肠消化前后总巯基含量均显著降低($P<0.05$)。与原料肉相比,80℃时消化前的蛋白质总巯基含量降低至(67.79±22.95) nmol/mg,减少了40.33%,经胃消化后蛋白质的总巯基含量降低了30.02%,经肠消化后的总巯基含量降低了36.43%。与消化前相比,经胃消化后的样品总巯基含量显著增加($P<0.05$),而在肠消化阶段总巯基含量又显著低于消化前($P<0.05$)。

随着中心温度的升高,牦牛肉MP中的总巯基含量不论是消化前还是经过胃肠消化均呈下降趋势,可能是当温度持续升高时,肌动球蛋白构象改变,巯基被氧化成二硫键,使巯基含量降低^[31]。另外,胃消化后的总巯基含量高于消化前的总巯基含量,可能是由于胃蛋白酶作用,使部分水解蛋白质的结构展开,暴露出更多的巯基基团并发生反应。在胃消化阶段,可能有大量二硫键被还原生成巯基,导致巯基含量增加。而肠消化阶段总巯基含量降低,猜测是由于胰蛋白酶水解全部蛋白质导致半胱氨酸或含半胱氨酸的短肽显现。韦婕好^[19]也发现与消化前相比,羊肉制品在经过模拟胃消化后巯基含量升高,肠消化后巯基含量降低,与本研究结果一致。

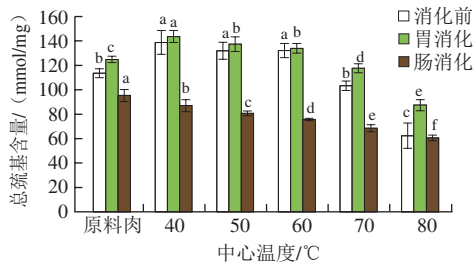
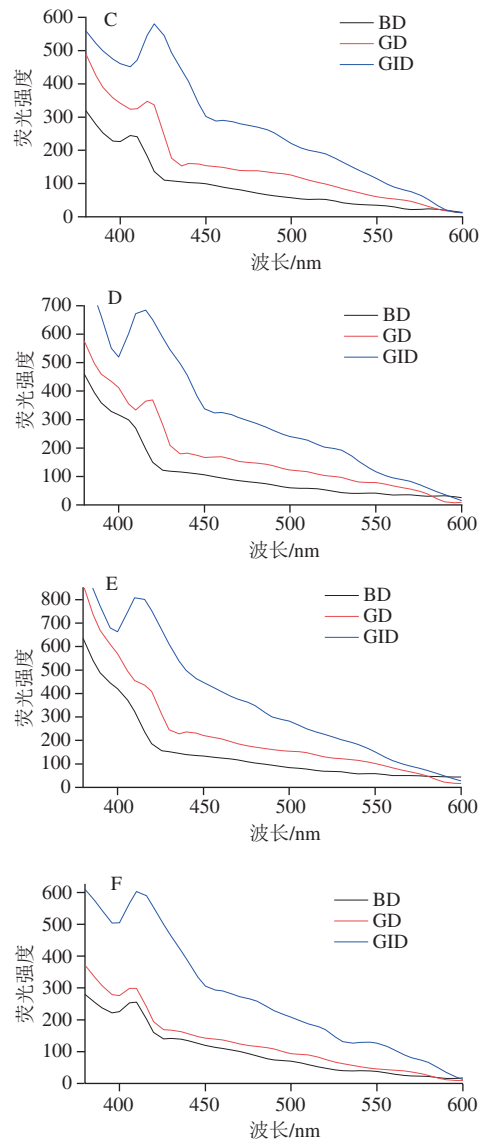
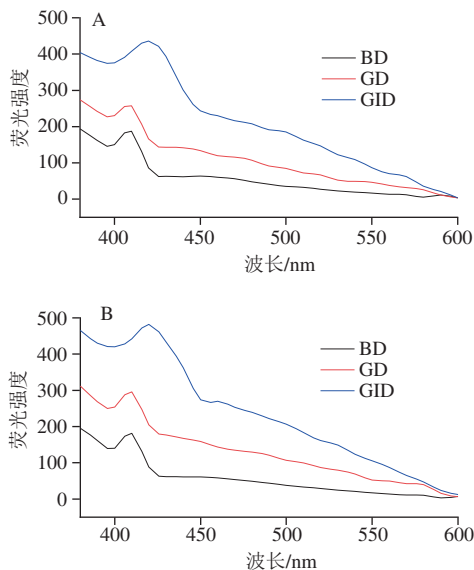


图2 不同中心温度下经消化前后牦牛肉蛋白质总巯基含量变化
Fig. 2 Changes in total sulfhydryl content of MP from yak meat cooked to different internal temperatures before and after digestion

2.4 牦牛肉Schiff碱含量的变化

Schiff碱含量象征着脂肪和蛋白质相互作用的程度。Schiff碱类物质存在较强的荧光特性，因而可以通过荧光光谱表征其含量的变化情况^[32]。如图3所示，牦牛肉蛋白质不论是消化前还是经胃肠消化后，随中心温度的升高，代表Schiff碱含量的荧光光谱强度先增大后降低，70 °C时其荧光强度最高，尤其是经肠消化后其荧光强度达到了807.9。此外，消化前的荧光光谱在410 nm波长处附近均出现了一个峰值，但经过肠消化后其峰值出现了不同程度的红移。在同一中心温度下，与消化前相比，经过胃肠消化后的Schiff碱荧光强度均增大，且肠消化后的荧光强度增幅更显著。

Schiff碱含量随中心温度的升高而增大，可能是煎制时蛋白质和脂质的氧化产物醛类发生了相互作用导致大量含Schiff碱的物质生成^[29]，此结果与Gatellier等^[21]的研究结果一致。肠消化后的Schiff碱荧光强度相比于胃消化更为剧烈，可能是由于胰蛋白酶在水解蛋白质与脂质的过程中，促使游离脂肪酸与氨基酸形成并相互作用，导致Schiff碱含量增加。此外，峰的位移反映了不同中心温度会产生众多丰富的Schiff碱类物质，它们的相互结合有助于蛋白质聚集并对其消化率产生影响。



A.原料肉; B~F. 40、50、60、70、80 °C; BD.消化前; GD.胃肠消化; GID.胃肠消化。图4、5同。

图3 不同中心温度下经消化前后牦牛肉蛋白质Schiff碱含量变化
Fig. 3 Changes in Schiff base content of MP from yak meat cooked to different internal temperatures before and after digestion

2.5 牦牛肉蛋白质紫外吸收光谱的变化

紫外吸收光谱的产生是因为蛋白质中包含酪氨酸、色氨酸等具有芳香环的氨基酸，并且它们的残基侧链基团能摄取紫外光，所以通过紫外吸收光谱表征蛋白质的三级结构^[33]。由图4可知，随着中心温度的升高，牦牛肉蛋白质的紫外吸收光谱强度逐渐增强。与原料肉相比，当中心温度达到80 °C时，消化前、胃消化及肠消化的紫外吸收光谱的吸光度分别增大了28.25%、23.98%和23.14%。在同一温度下，与消化前相比，经过胃、肠消化后其吸光度显著增强，且肠消化后在274 nm波长处的特征吸收峰发生轻微蓝移。80 °C时，经肠消化后274 nm波长处的特征吸收峰吸光度是胃消化后的1.03倍，是消

化前的1.10倍。猜测是由于胰蛋白酶使MP中的部分氨基酸基团结构改变,这与康怀彬等^[34]的研究结果一致。此外,蛋白质紫外吸收强度随中心温度的升高逐渐增强,可能是由于高温处理使MP展开,越来越多的芳香族氨基酸如色氨酸和酪氨酸等残基暴露于蛋白质表面,其所处的微环境由非极性向极性转变^[35]。

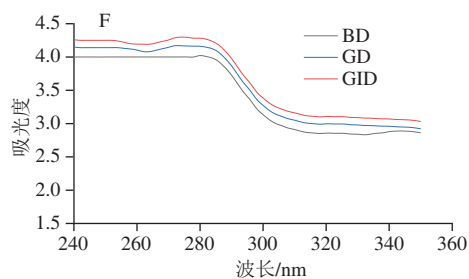
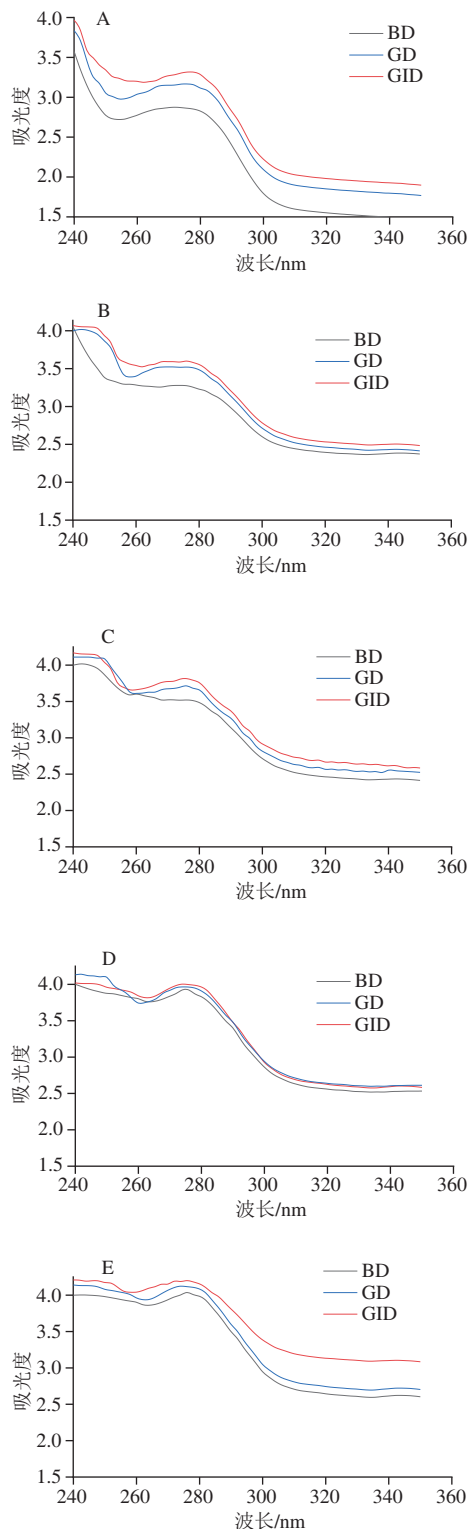
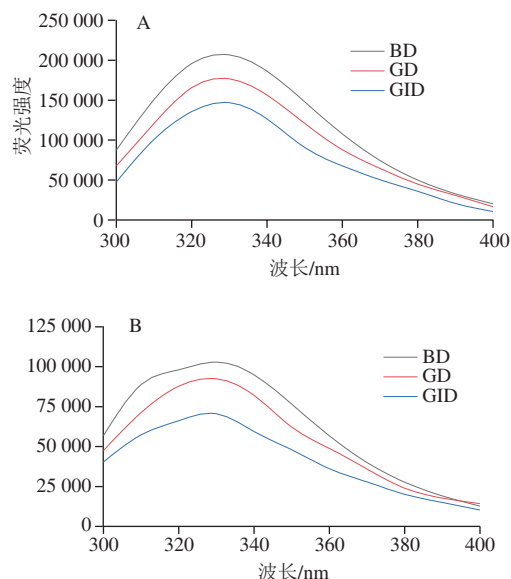


图4 不同中心温度下经消化前后牦牛肉蛋白质紫外吸收光谱变化
Fig. 4 Changes in UV absorption spectra of MP from yak meat cooked to different internal temperatures before and after digestion

2.6 牦牛肉蛋白质内源荧光光谱的变化

内源荧光光谱是监测色氨酸残基的环境变化、表征蛋白质分子三级结构的重要手段之一。内源荧光光谱强度的变化在一定程度上反映出色氨酸的氧化程度^[36]。如图5所示,随着中心温度的升高,MP不论是经胃肠消化前还是消化后,其内源荧光光谱强度均逐渐降低。当中心温度为80℃时,消化前、胃消化及肠消化后的蛋白质内源荧光强度与原料肉相比分别降低了72.16%、72.36%和76.23%。同一中心温度下,与消化前相比,经胃肠消化后的蛋白质内源荧光光谱强度降低,且经肠消化后更为明显,80℃时经胃肠消化后在330 nm波长处的最大内源荧光光谱强度与消化前相比分别降低了51.59%和74.25%。经过胃肠消化后的内源荧光强度降低,尤其是肠消化后荧光强度下降更明显,可能是牦牛肉蛋白质经过模拟胃肠道消化后氧化加剧,蛋白质肽链展开,使活性基团暴露,分子间相互作用力增强后小分子蛋白聚集,导致更多色氨酸残基被包埋,从而引起内源荧光强度下降^[37]。



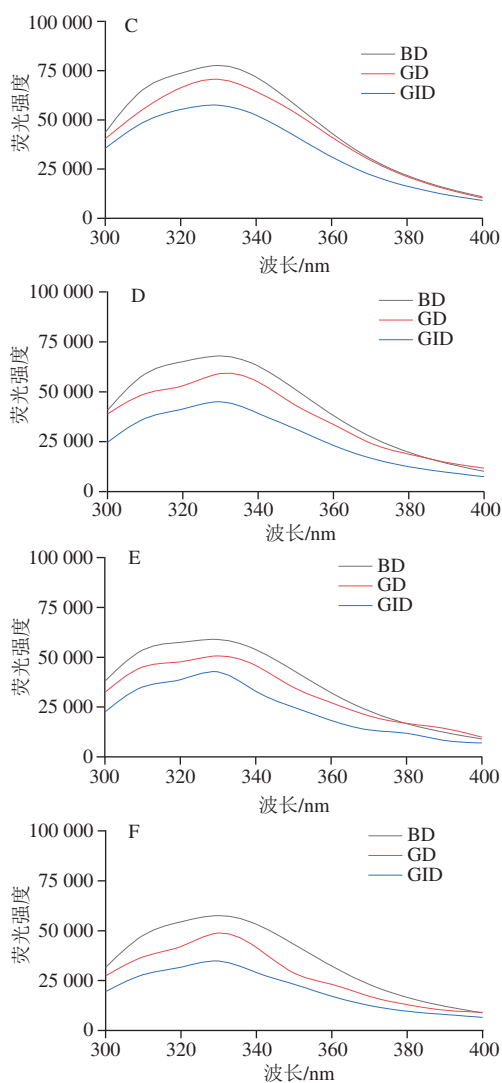


图5 不同中心温度下经消化前后牦牛肉蛋白质内源荧光光谱变化

Fig. 5 Changes in endogenous fluorescence spectra of MP from yak meat cooked to different internal temperatures before and after digestion

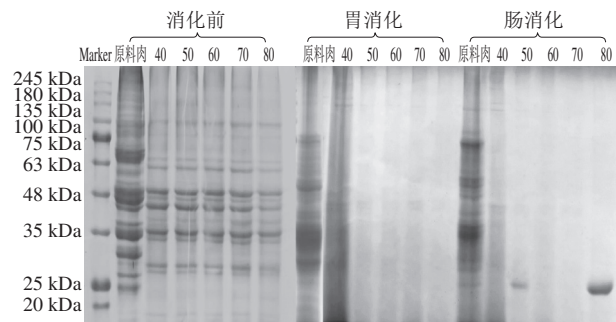
2.7 牦牛肉蛋白质SDS-PAGE的变化

由图6可知，牦牛肉烹饪至不同中心温度后其MP结构发生降解与聚集。随着中心温度的升高，会造成长链蛋白发生不同程度的断裂，短链蛋白相对含量进一步增加^[38]。通过对图6分析可知，出现分子质量由大到小的肌球蛋白（100 kDa）、肌动蛋白（43 kDa）、原肌球蛋白（35 kDa）、肌球蛋白轻链（10~30 kDa）条带。

消化前，随着中心温度的升高，在245~100 kDa范围内的电泳条带均逐渐模糊至消失， α -肌动蛋白（100 kDa）条带随着温度的升高逐渐变浅，由此可推测蛋白质在较低烹饪温度下发生适当氧化，其结构得以适当修饰。43 kDa处的肌动蛋白条带略有降解，但没有明显的变化趋势，说明肌动蛋白具有热稳定性，且其热稳定性明显高于肌球蛋白，Tornberg^[39]研究发现，在鸡肉加热过程中，肌动蛋白电泳条带比肌球蛋白消失得更慢，与本研究结果一致。此外，35~48 kDa范围内的蛋白质条

带数量增加，说明此时蛋白质发生了降解，陈春梅等^[40]研究发现在不同蒸煮温度下的羊肉MP在36~55 kDa之间也出现降解情况。20 kDa的条带几乎消失，这表明在氧化过程中羟自由基对肽链的进攻能够使其某些部位发生断裂，从而产生蛋白亚基，这也说明了氧化一定程度对蛋白质具有降解作用。

经胃消化后，原料肉蛋白质在分子质量75 kDa处的条带还清晰可见。随着中心温度的升高，在135 kDa处所对应的条带比较模糊甚至消失。表明煎制诱导肌球蛋白重链受热氧化，使蛋白质部分结构展开，被胃蛋白酶水解成小分子蛋白，易于被消化吸收。经肠消化后，原料肉蛋白质在分子质量25~75 kDa范围内的条带可见。随着中心温度的升高，除50℃和80℃处理组在25 kDa处出现条带外，各处理组均无可见条带。由于蛋白质在胰蛋白酶的作用下被大量水解，蛋白质结构被彻底破坏，所以不可能出现蛋白质聚集，阻止蛋白酶与酶切点结合的现象，从而造成肠消化后电泳图无条带的现象。在25 kDa或更低的分子质量处看到模糊的泳道，有可能是蛋白质被胰蛋白酶充分水解成小段的肽，导致短肽无法继续被水解。SDS-PAGE结果显示了MP的交联与聚集，表明经过胃肠消化后的蛋白质再次氧化后其降解作用更强。



40~80表示中心温度（℃）。

图6 不同中心温度下经胃肠消化前后MP的SDS-PAGE图

Fig. 6 SDS-PAGE patterns of MP from yak meat cooked to different central temperatures before and after gastrointestinal digestion

3 结论

经烹饪后的牦牛肉蛋白质消化率随温度的升高呈总体下降趋势，主要与蛋白质的氧化及结构变化有关。在模拟胃肠道消化过程中发现，随着烹饪温度的升高，蛋白质氧化程度逐渐加剧，蛋白质肽链展开，导致表征蛋白三级结构的芳香族氨基酸及活性基团暴露，且在肠消化阶段更明显。其次，烹饪后的蛋白质在胃肠道消化过程中的水解导致大量游离氨基酸显现，间接催化了蛋白质的氧化。后续可以通过蛋白质组学、脂质组学和代谢组学等方法开展牦牛肉在消化过程中蛋白质、脂肪动态变化及其消化规律的深入研究。此外，可以在烹饪牦牛肉过程中添加一些天然抗氧化剂，增添牦牛肉产品的风味，保证产品的营养价值。

参考文献:

- [1] WANG H, CHAI Z X, HU D, et al. A global analysis of CNVs in diverse yak populations using whole-genome resequencing[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 1-12. DOI:10.1186/s12864-019-5451-5.
- [2] 张子璇, 赵姗姗, 胡翔宇, 等. 我国牦牛产业标准体系现状与发展对策[J]. 食品工业, 2022, 43(11): 237-242.
- [3] CAO X K, CHENG J, HUANG Y Z, et al. Growth performance and meat quality evaluations in three-way cross cattle developed for the Tibetan plateau and their molecular understanding by integrative omics analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 67(1): 541-550. DOI:10.1021/acs.jafc.8b05477.
- [4] GU X D, SUN W J, YI K G, et al. Comparison of muscle lipidomes between cattle-yak, yak, and cattle using UPLC-MS/MS[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 103: 104113. DOI:10.1016/j.jfca.2021.104113.
- [5] WANG L L, HAN L, MA X L, et al. Effect of mitochondrial apoptotic activation through the mitochondrial membrane permeability transition pore on yak meat tenderness during postmortem aging[J]. Food Chemistry, 2017, 234: 323-331. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.04.185.
- [6] 胡春林, 谢晶. 蛋白质氧化对肉食用品质影响的研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(17): 275-281. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200913-159.
- [7] LI C B, ZHOU G H, XU X L. Dynamical changes of beef intramuscular connective tissue and muscle fiber during heating and their effects on beef shear force[J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 3(4): 521-527. DOI:10.1007/s11947-008-0117-3.
- [8] 祝超智, 陈画, 田玮, 等. 肉类蛋白质消化性影响因素研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(21): 349-357. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210622-260.
- [9] VAN HECKE T, VANDEN BUSSCHE J, VANHAECKE L, et al. Nitrite curing of chicken, pork, and beef inhibits oxidation but does not affect N-nitroso compound (NOC)-specific DNA adduct formation during *in vitro* digestion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(8): 1980-1988. DOI:10.1021/jf4057583.
- [10] WU P, CHEN X D. On designing biomimic *in vitro* human and animal digestion track models: ideas, current and future devices[J]. Current Opinion in Food Science, 2020, 35: 10-19. DOI:10.1016/j.cofs.2019.12.004.
- [11] BHAT Z F, MORTON J D, ZHANG X, et al. Sous-vide cooking improves the quality and *in vitro* digestibility of *Semotendinosus* from culled dairy cows[J]. Food Research International, 2020, 127: 108708. DOI:10.1016/j.foodres.2019.108708.
- [12] LIU M, LIU G Y, YANG Y, et al. Thermal processing influences the digestibility and immunoreactivity of muscle proteins of *Scylla paramamosain*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 98: 559-567. DOI:10.1016/j.lwt.2018.09.027.
- [13] REMOND D, MACHEBEUF M, YVEN C, et al. Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal is influenced by chewing efficiency in elderly subjects[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2007, 85(5): 1286-1292. DOI:10.1093/ajcn/85.5.1286.
- [14] LI L, LIU Y, ZOU X Y, et al. *In vitro* protein digestibility of pork products is affected by the method of processing[J]. Food Research International, 2017, 92: 88-94. DOI:10.1016/j.foodres.2016.12.024.
- [15] BAX M L, AUBRY L, FERREIRA C, et al. Cooking temperature is a key determinant of *in vitro* meat protein digestion rate: investigation of underlying mechanisms[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(10): 2569-2576. DOI:10.1021/jf205280y.
- [16] 张兰, 高天丽, 刘永峰, 等. 3种传统中式高温烹饪工艺对牛肉食用品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(11): 126-132. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201611022.
- [17] 布鑫荣, 王惠惠, 宋艳艳, 等. 羟自由基和高铁肌红蛋白氧化体系对牦牛肉肌纤维蛋白氨基酸含量变化的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(5): 1-10. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201207-075.
- [18] YIN Y T, PEREIRA J, ZHOU L, et al. Insight into the effects of sous vide on cathepsin B and L activities, protein degradation and the ultrastructure of beef[J]. Foods, 2020, 9(10): 1441. DOI:10.3390/foods9101441.
- [19] 韦婕妤. 热加工方式对羊肉制品蛋白质氧化及体外模拟消化性的影响研究[D]. 成都: 西南民族大学, 2019.
- [20] 万红兵, 李海鹏, 雷元华, 等. 烹饪熟度对牛肉肌原纤维蛋白结构特性和氧化特性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 17-25. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200717-229.
- [21] GATELLIER P, SANTE-LHOUELLIER V, PORTANGUEN S, et al. Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking[J]. Meat Science, 2009, 83(4): 651-656. DOI:10.1016/j.meatsci.2009.07.015.
- [22] 张海璐, 黄翔, 杨燃, 等. 氧化对羊肉肌原纤维蛋白分子与理化特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 8-14. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200615-197.
- [23] 郑云芳, 李晨, 张芳, 等. 热处理对鲈鱼肌原纤维蛋白结构及功能特性的影响[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2022, 50(1): 139-146. DOI:10.7631/issn.1000-2243.21288.
- [24] LIU G, XIONG Y L. Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and *in vitro* digestibility of oxidized myosin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(3): 624-630. DOI:10.1021/jf990520h.
- [25] SANTÉ-LHOUELLIER V, ENGEL E, AUBRY L, et al. Effect of animal (lamb) diet and meat storage on myofibrillar protein oxidation and *in vitro* digestibility[J]. Meat Science, 2008, 79(4): 777-783. DOI:10.1016/j.meatsci.2007.11.011.
- [26] RYSMAN T, VAN HECKE T, VAN POUCKE C, et al. Protein oxidation and proteolysis during storage and *in vitro* digestion of pork and beef patties[J]. Food Chemistry, 2016, 209: 177-184. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.04.027.
- [27] WANG H H, SONG Y Y, LIU Z Q, et al. Effects of iron-catalyzed and metmyoglobin oxidizing systems on biochemical properties of yak muscle myofibrillar protein[J]. Meat Science, 2020, 166: 108041. DOI:10.1016/j.meatsci.2019.108041.
- [28] VAN HECKE T, VOSSEN E, VANDEN BUSSCHE J, et al. Fat content and nitrite-curing influence the formation of oxidation products and NOC-specific DNA adducts during *in vitro* digestion of meat[J]. PLoS ONE, 2014, 9(6): 101122. DOI:10.1371/journal.pone.0101122.
- [29] 胡吕霖, 任思婕, 沈清, 等. 不同烹饪方式及体外模拟消化环境对鲟鱼蛋白质氧化及消化性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 63-70. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820010.
- [30] 李晨伊. 亚硝酸钠对西式火腿中肌原纤维蛋白氧化影响的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [31] LUND M N, HEINONEN M, BARON C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: a review[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(1): 83-95. DOI:10.1002/mnfr.201000453.
- [32] 张来新, 朱海云. 席夫碱化学研究的新进展[J]. 化学工程师, 2015, 29(5): 64-66. DOI:10.16247/j.cnki.23-1171/tq.20150564.
- [33] HIROSE Y, FUJITA T, ISHII T, et al. Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan[J]. Food Chemistry, 2009, 119(4): 1300-1306. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.09.008.
- [34] 康彬彬, 邹良亮, 张慧芸, 等. 高温处理对牛肉蛋白质化学作用力及肌原纤维蛋白结构的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 80-86. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201823013.
- [35] 郭雨萍. 超高压结合热处理对猪肉蛋白质氧化、结构及特性的影响[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2016.
- [36] PENG Q H, KHAN N A, WANG Z S, et al. Moist and dry heating-induced changes in protein molecular structure, protein subfractions, and nutrient profiles in camelina seeds[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(1): 446-457. DOI:10.3168/jds.2013-7298.
- [37] ESTÉVEZ M, KYLLI P, PUOLANNE E, et al. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions[J]. Meat Science, 2008, 80(4): 1290-1296. DOI:10.1016/j.meatsci.2008.06.004.
- [38] PROMÉYRAT A, GATELLIER P, LEBRET B, et al. Evaluation of protein aggregation in cooked meat[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 412-417. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.12.057.
- [39] TORNBERG E. Effects of heat on meat proteins-implications on structure and quality of meat products[J]. Meat Science, 2005, 70(3): 493-508. DOI:10.1016/j.meatsci.2004.11.021.
- [40] 陈春梅, 陆辰燕, 沈银涵, 等. 蒸煮温度对羊肉肌原纤维蛋白特性的影响[J]. 肉类研究, 2020, 34(7): 40-45. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20200426-104.