

# 响应面法优化木瓜蛋白酶嫩化牛肉工艺

周珠法

(浙江农业商贸职业学院烹饪旅游系,浙江绍兴 312000)

**摘要:**为了提高牛肉品质,采用木瓜蛋白酶对牛肉嫩化工艺进行优化。以酶浓度、pH、处理温度、处理时间为考察因素,在单因素实验的基础上,采用 Box-Behnken 实验设计进行 4 因素 3 水平的响应面分析优化,确定最佳牛肉嫩化条件为:酶浓度 0.07%, pH6.9, 处理温度 60 ℃, 处理时间 1.8 h。在此最佳嫩化条件下牛肉的持水率、弹性、内聚性及咀嚼性较对照组显著提高( $p < 0.01$ ),烹饪失水率、剪切力和硬度较对照组显著降低( $p < 0.01$ ),感官评价达到 94.20 分,较优化前提高了 39.56%。初步机制研究发现木瓜蛋白酶可以降解牛肉肌纤维蛋白来提高牛肉嫩度。

**关键词:**木瓜蛋白酶,牛肉,嫩化,响应面优化

## Optimization of beef tenderizing technology with papain by response surface methodology

ZHOU Zhu-fa

(Culinary Tourism Department, Zhejiang Agricultural Business College, Shaoxing 312000, China)

**Abstract:** In order to improve the quality of beef, papain was adopted to optimize the beef tenderness. Based on the single factor experiments, the enzyme concentration, pH, processing temperature, processing time, which had a significant influence on the shear force and sensory evaluation were optimized by response surface optimization using Box-Behnken experimental design. The optimum tenderizing conditions were determined as follows: enzyme concentration of 0.07%, pH6.9, processing temperature of 60 ℃, processing time of 1.8 h. Under the optimum conditions, the water holding capacity, elasticity, cohesion, chewiness of beef were significantly raised, while the cooking water loss rate, shear force and hardness were remarkable reduced, compared to the control group ( $p < 0.01$ ). The sensory evaluation reached 94.20 points after optimization, which increased by 39.56%. The preliminary study have shown that papain could degrade beef muscle fiber to improve tenderness of beef.

**Key words:** papain; beef; tenderness; response surface methodology

中图分类号: TS251.52

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)02-0086-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.02.017

牛肉富含人体必需的氨基酸和部分微量元素,是我国主要肉类食品之一。相比于猪肉而言,牛肉的蛋白质含量高,脂肪和胆固醇含量较低,营养价值丰富,深受广大消费者的喜爱<sup>[1]</sup>。随着我国居民消费水平的提高,牛肉在肉类消费总量中的比重逐年增加,同时消费者对牛肉品质也提出更高要求。嫩度是决定牛肉品质最重要的因素,也是消费者购买意愿的重要指标<sup>[2]</sup>,所以嫩度的高低在一定程度上决定着牛肉的品质和价格,因此,如何提高牛肉嫩度成为改善牛肉品质的基础。

近年来,许多学者一直致力于改善肉类嫩度的研究,并提出多种嫩化方法,如低温吊挂、机械滚揉、电刺激、超声波、钙盐注射、磷酸盐处理、高压处理、外源酶处理等<sup>[3-4]</sup>。在众多方法中,外源酶嫩化法因具有操作简单、不需要额外增加设备、基本不改变生产工艺、显著提高牛肉嫩度等优点,而受到肉类研究者的重视<sup>[5-7]</sup>。木瓜蛋白酶是最常用的肉类嫩化外

源酶,其酶活高、性质稳定、蛋白水解能力强、绿色安全,不仅可以提高肉的嫩度,改善肉的风味,而且不产生不良风味,因此广泛应用于食品加工行业<sup>[8-9]</sup>。赵立等<sup>[10]</sup>以剪切力为评价指标,对木瓜蛋白酶嫩化鸭肉的工艺进行优化。肖夏等<sup>[11]</sup>以剪切力为评价指标,辅以质构特性,考察了复合酶(木瓜蛋白酶与菠萝蛋白酶)嫩化牛肉工艺,处理后牛肉剪切力显著下降,质构特性较好保持。林志民等<sup>[12]</sup>以感官评价为评价指标,考察木瓜蛋白酶对牛肉嫩化的影响,发现酶浓度过大时会导致牛肉的过度嫩化,降低感官评价。李丽杰等<sup>[13]</sup>以剪切力为评价指标,辅以质构特性,研究木瓜蛋白酶法嫩化鹿肉工艺,嫩化后鹿肉剪切力值显著降低( $p < 0.01$ ),咀嚼力值与剪切力值存在正相关关系,弹性与剪切力不相关。夏军军等<sup>[14]</sup>以剪切力为评价指标,考察了木瓜蛋白酶嫩化牛腿肉工艺条件,在优化的条件下牛腿肉的剪切力与对照组相比显著降低。目前牛肉嫩化工艺是以剪切力

收稿日期:2017-06-26

作者简介:周珠法(1963-),男,本科,副教授,研究方向:中式烹调、饮食文化,E-mail:1161981330@qq.com。

基金项目:2013 绍兴市高等学校精品课程(JP201204);2016 年度四川省哲学社会科学重点研究基地川菜发展研究中心(CCI6W05)。

作为条件筛选的唯一或主要评价指标,以确定最优条件。然而,剪切力最低条件下,牛肉感官评价、质构特性往往不是最佳的。牛肉嫩化最终目标还是为食用服务,过度追求剪切力的降低,反而会影响牛肉的食用品质。陶瑞等<sup>[15]</sup>研究发现,木瓜蛋白酶过大导致肉块老化,水分流失,感官评价下降,但是剪切力却升高。因此,嫩化工艺条件的确定有必要采用剪切力和感官评价双指标来评价优化的效果,以确保较佳的食用品质。

本研究采用响应面优化法,以牛肉嫩化效果广泛采用的剪切力测定和感官评价作为评价指标<sup>[16]</sup>,考察木瓜蛋白酶对牛肉嫩化的影响,并对优化后的嫩化牛肉与对照组进行质构特性及系水性比较,最后进行初步嫩化机制研究,以期得到更加客观、准确的评价结果,为改善外源蛋白酶在牛肉加工技术中的应用提供一定的研究思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

牛肉 外脊,市售;木瓜蛋白酶 酶活 10 万 U/g,西安瑞盈生物科技有限公司;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾 北京康普汇维科技有限公司;氯化镁、氯化钾 国药集团工业股份有限公司;乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA) 山东佰仟化工有限公司;HE 染色试剂盒 北京诺博莱德科技有限公司。

TA.XT Plus 物性测定仪 英国 Stable Micro Systems 公司;10001 型电子天平 常州市宏衡电子仪器厂;HH-6 型数显恒温水浴锅 金坛市郎博仪器制造有限公司;控温多用高速组织捣碎机 常州恒隆仪器有限公司;CTH1850R 台式高速冷冻离心机 湖南湘立科学仪器有限公司;UV1901 紫外可见分光光度计 上海奥析科学仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 牛肉嫩化处理 精密称取 0.6 g 木瓜蛋白酶,置于 1 L pH7.0 的磷酸盐缓冲液中,搅均,4 ℃ 保存待用。

将牛肉剔除结缔组织、淋巴及脂肪,顺着肌纤维纹络切成 3 cm × 3 cm × 10 cm 的肉块,采用均匀注射法进行嫩化处理,每块肉注射 0.06% 的木瓜蛋白酶 20 mL,在 50 ℃ 条件下处理 2 h。

1.2.2 单因素实验 固定 pH7.0,处理温度 50 ℃,处理时间 2 h,考察不同酶浓度(0%、0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%、0.12%、0.14%)对牛肉剪切力和感官评价的影响;固定酶浓度 0.08%,处理温度 50 ℃,处理时间 2 h,考察不同 pH(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)对牛肉剪切力和感官评价的影响;固定酶浓度 0.08%,pH6.5,处理时间 2 h,考察不同处理温度(40、45、50、55、60、65 ℃)对牛肉剪切力和感官评价的影响;固定酶浓度 0.08%,pH6.5,处理温度 55 ℃,考察处理时间(0、1、1.5、2、2.5、3、3.5 h)对牛肉剪切力和感官评价的影响,实验重复 3 次。进行单因素实验,考察各因素对牛肉剪切力和感官评价的影响。

1.2.3 响应面优化实验 以单因素实验结果为依据,采用 Box-Behnken 中心组合实验设计,对牛肉嫩化工艺进行响应面优化。实验设计见表 1,实验重复 3 次。

表 1 牛肉嫩化 Box-Behnken 设计因素水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken central composite design for beef tenderness

因素	水平		
	-1	0	1
A 酶浓度(%)	0.06	0.08	0.1
B pH	6.0	6.5	7.0
C 处理温度(℃)	50	55	60
D 处理时间(h)	1.5	2	2.5

1.2.4 剪切力的测定 按 NY/T 1180-2006<sup>[17]</sup> 方法进行测定。

1.2.5 感官评价 参考 GB/T 16291.1-2012<sup>[18]</sup> 以及金慧玉<sup>[5]</sup>、韩东洁等<sup>[19]</sup> 的评价方法。将嫩化处理后的牛肉切成 1.5 cm × 1.5 cm × 0.5 cm 小块,放入蒸煮袋中,在 95 ℃ 水浴锅中加热至牛肉中心达到 70 ℃,取出牛肉冷却至室温,牛肉品质从色泽、气味、口感、外观 4 个方面进行评价,选择接受过专业训练的 10 名食品人士组成感官评定小组,根据牛肉感官质量评分标准(表 2)给予评分,计算平均值。

1.2.6 烹饪失水率和持水率的测定 按响应面优化条件对牛肉进行嫩化处理,同时以不加木瓜蛋白酶,其他条件同嫩化处理的牛肉作为对照组,按 1.2.5 中

表 2 牛肉的感官评定标准

Table 2 Standards of sensory evaluation of beef

色泽(25 分)	气味(25 分)	口感(25 分)	外观(25 分)
色泽棕黄,略显玫瑰红,且色泽均匀(20~25)	香气浓郁且纯正,整体气味协调(20~25)	口感甘滑纯美,牛肉韧爽有嚼劲,不塞牙,无粗糙感(20~25)	肉块完整,结构紧密,有油光和弹性(20~25)
色泽棕黄或棕褐,不均匀,且无光泽(10~19)	香气较浓郁且纯正,但是残留时间较短(10~19)	肉质较柔润,口感一般,口味基本调和,不塞牙,轻微粗糙感(10~19)	肉块较完整,结构较紧密,有油光,无弹性或者无油光,有弹性(10~19)
肉体呈黑褐色,无肌肉红色,色泽不均匀(1~9)	香味淡且不纯正,整体气味不协调(1~9)	口感饱满度差,牛肉过干过硬塞牙,粗糙,下咽较困难;或者牛肉过软,疏松,没有嚼劲(1~9)	肉块松散不完整,无油光,无弹性(1~9)

煮制条件进行煮制,用滤纸擦干牛肉表面水分,按照孟祥忍等<sup>[20]</sup>的方法测定失水率和持水率。

1.2.7 质构特性分析 按照罗亚兰等<sup>[21]</sup>的测定方法对响应面优化条件嫩化处理和未加木瓜蛋白酶嫩化处理的对照组牛肉进行质构特性分析,测试条件:采用TPA模式,探头型号:P/50;下行速度:4 mm/s;测试速度:5 mm/s;返回速度:5 mm/s;压缩样品高度为50%;时间:5 s;触发力:5 g。测试项目有硬度、弹性、咀嚼性和内聚力。

1.2.8 肌原纤维小片化指数(MFI值)测定 按武军等<sup>[22]</sup>的测定方法对1.2.7中优化处理组和对照组牛肉进行测定。

1.2.9 肌纤维密度和肌纤维直径的测定 参考Olson D<sup>[23]</sup>及王海丽等的实验方法<sup>[24]</sup>,将1.2.7中优化处理组和对照组牛肉,顺肌纤维方向切成3 cm × 2 cm × 1 cm的组织块,固定在4%甲醛溶液中,石蜡包埋,常规切片,厚度4~6 μm,然后使用木精-伊红染液染色10 min,水洗至无色,中心树脂封固,每个样品制3片标本备用,用显微观察,并用显微图像分析仪测定以下项目:

肌纤维密度:在10 × 10倍光镜下随机选10个视野,统计视野中肌纤维根数,换算得到1 mm<sup>2</sup>的纤维数目;

肌纤维直径:在10 × 40倍光镜下随机测量100根肌纤维的直径,其平均值即为肌纤维直径。

1.2.10 数据分析 实验数据以平均值 ± 标准差表示,采用Orign 8.0、SPSS 19.0及Design-Expert 8.0软件进行数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素实验

2.1.1 酶浓度对牛肉嫩化的影响 由图1可以看出,随着木瓜蛋白酶浓度的增加,牛肉的剪切力逐渐降低,而感官评价却表现为先增加后降低的趋势。当酶浓度为0.08%时,剪切力为27.27 N,感官评价达到最高,为74.30分;当酶浓度为0.14%时,剪切力最低,为19.31 N,感官评价为65.60分。这是因为酶浓度增加,反应速度也加快,单位时间内牛肉中肌原纤维的降解程度也相应增加,剪切力就越低,但是当酶浓度过大时(超过0.08%),牛肉中蛋白会因过度降解而失去食用价值<sup>[15]</sup>,感官评价也开始降低。

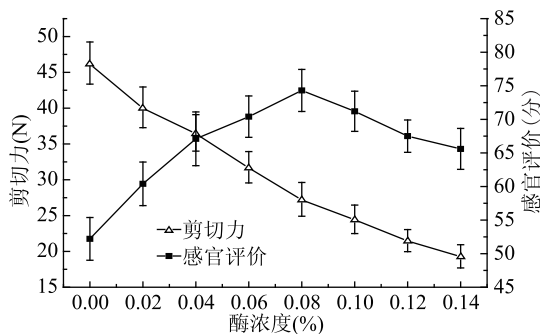


图1 酶浓度对剪切力和感官评价的影响  
Fig.1 The influence of enzyme concentration on shear force and sensory evaluation

2.1.2 pH对牛肉嫩化的影响 由图2可以看出,随着pH的增加,牛肉的剪切力呈现先快速下降而后缓慢增加的趋势,而感官评价呈先增后降的趋势。当pH为6.5时,剪切力最低,为25.23 N,而感官评价最高,为78.10分。这可能是由于pH6.5为木瓜蛋白酶的最适pH,此时木瓜蛋白酶处于最佳构象状态,有利于酶解反应的进行<sup>[24]</sup>。

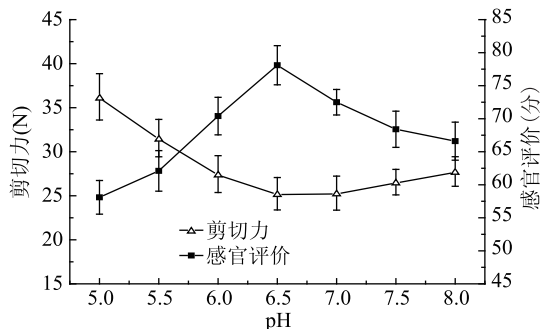


图2 pH对剪切力和感官评价的影响  
Fig.2 The influence of pH on shear force and sensory evaluation

2.1.3 处理温度对牛肉嫩化的影响 由图3可以看出,不同温度条件下,剪切力和感官评价呈现和pH类似的变化趋势,当温度为55℃时,剪切力最低,为20.78 N,而感官评价最高,为79.40分。这是因为随着温度升高,酶活增加,剪切力下降,感官评价增加;当温度过高,部分木瓜蛋白酶发生变性失活,导致剪切力增加,牛肉也由于部分蛋白质变性而老化,感官评价下降<sup>[11]</sup>。

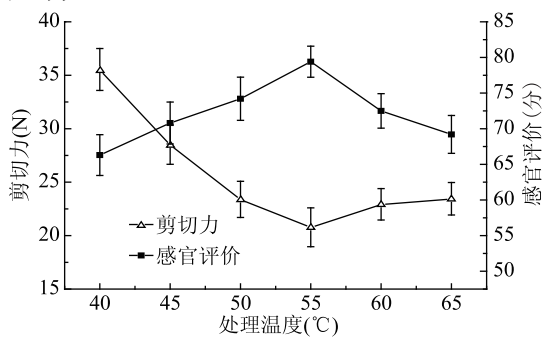


图3 处理温度对剪切力和感官评价的影响  
Fig.3 The influence of treatment temperature on shear force and sensory evaluation

2.1.4 处理时间对牛肉嫩化的影响 由图4可以看出,随着处理时间的增加,剪切力和感官评价变化趋势与酶浓度类似,当处理时间为2 h时,剪切力为22.82 N,感官评价达到最高,为81.30分;当处理时间为3.5 h时,剪切力最低,为6.13 N,感官评价为67.20分。处理时间过短,牛肉嫩化不够,处理时间过长,牛肉的完整性又会被破坏,导致感官评价降低<sup>[14]</sup>。综上所述,选择酶浓度0.08%、pH6.5、处理温度55℃,处理时间2.0 h较为合适。

### 2.2 响应面优化实验

2.2.1 响应面实验设计与结果 单因素实验结果可以看出:剪切力和感官评价的变化趋势不完全相关。当剪切力最低时,感官评价并不是最高的;但是感官

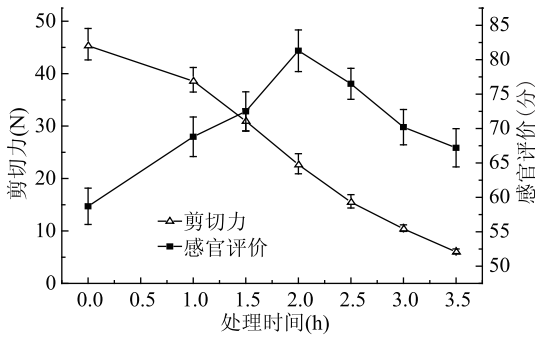


图4 处理时间对剪切力和感官评价的影响

Fig.4 The influence of treatment time on shear force and sensory evaluation

评价最高时,剪切力均较低,因此,采用感官评价为响应值进行响应面优化,实验结果见表3。

表3 牛肉嫩化的 Box-Behnken 实验结果

Table 3 The results of Box-Behnken experiment for beef tenderness

实验号	A 酶浓度	B pH	C 处理温度	D 处理时间	感官评价(分)
1	-1	-1	0	0	69.2 ± 3.24
2	1	-1	0	0	68.6 ± 3.51
3	-1	1	0	0	84.8 ± 4.33
4	1	1	0	0	72.4 ± 4.46
5	0	0	-1	-1	81.7 ± 5.83
6	0	0	1	-1	87.5 ± 4.28
7	0	0	-1	1	83.8 ± 5.79
8	0	0	1	1	83.9 ± 3.64
9	-1	0	0	-1	82.6 ± 4.71
10	1	0	0	-1	68.4 ± 3.17
11	-1	0	0	1	72.7 ± 4.72
12	1	0	0	1	73.4 ± 5.40
13	0	-1	-1	0	81.8 ± 5.25
14	0	1	-1	0	79.1 ± 4.76
15	0	-1	1	0	70.4 ± 3.91
16	0	1	1	0	90.6 ± 6.13
17	-1	0	-1	0	80.7 ± 3.87
18	1	0	-1	0	81.0 ± 4.69
19	-1	0	1	0	84.3 ± 3.54
20	1	0	1	0	68.4 ± 4.13
21	0	-1	0	-1	74.0 ± 4.68
22	0	1	0	-1	78.8 ± 3.39
23	0	-1	0	1	68.8 ± 2.91
24	0	1	0	1	81.3 ± 4.53
25	0	0	0	0	87.4 ± 4.15
26	0	0	0	0	88.3 ± 3.94
27	0	0	0	0	88.5 ± 4.27

2.2.2 模型的建立及方差分析 应用 Design Expert 8.0 软件对响应值和各因素进行回归拟合,得到木瓜蛋白酶嫩化牛肉工艺中感官评价(Y)与酶浓度(A)、pH(B)、处理温度(C)、处理时间(D)这4个因素之间的二次回归方程:

$$Y = -773.28333 + 6649.58333A + 250.08333B -$$

$$9.56500C + 26.18333D - 295.00000AB - 40.50000AC + 372.50000AD + 2.29000BC + 7.70000BD - 0.57000CD - 21406.25000A^2 - 27.60000B^2 - 9.00000E - 003C^2 - 19.05000D^2$$

以感官评价为响应值,根据表3 实验结果,应用 Design Expert 8.0 软件对牛肉嫩化工艺的模型进行回归分析,结果见表4。

从表4 可以看出,回归模型  $p < 0.0001$ ,说明构建的模型极显著。失拟项  $p > 0.05$ ,失拟不显著,说明该方程可以很好的描述各嫩化条件和牛肉感官评价的关系。该模型决定系数  $R^2 = 0.9645$ ,表明该模型可以解释响应面中 96.45% 的可变性,可以用于牛肉嫩化的优化。根据  $F$  值大小可知,影响感官评价因素的主次顺序为:pH(B) > 酶浓度(A) > 处理时间(D) > 处理温度(C),其中一次项中因素 A、B 对感官评价影响极显著( $p < 0.01$ ),交互项中 AC、BC、AD 对感官评价影响极显著( $p < 0.01$ ),AB 对感官评价影响显著( $p < 0.05$ ),平方项中  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $D^2$  对感官评价影响极显著( $p < 0.01$ )。

2.2.3 响应曲面及等高线分析结果 对构建的回归模型进行响应面分析,考察了各因素间交互作用与响应值之间的响应曲面图,结果见图5。从图5 可以看出:等高线的中心区域,感官评价最高,由中心向边缘逐渐降低,这和陶瑞等<sup>[15]</sup>的研究结果一致。pH 与处理温度的响应曲面最为陡峭,说明两者之间交互作用对感官评价的影响最为显著,固定处理温度或 pH,感官评价和另一个因素呈非线性增长,说明二者交互作用极显著,这和夏军军等<sup>[14]</sup>的研究结果相同,酶浓度与处理时间及处理温度之间关系也类似于 pH 与处理温度。酶浓度与 pH 之间的交互曲面较为陡峭,等高线呈椭圆,固定酶浓度或 pH,感官评价随着另一因素的升高呈先升高后下降的趋势,且变化较为明显,这表明二者交互作用显著,这与表4 中回归分析结果是一致的。

对回归方程进行偏导求解,得出感官评价最高,即牛肉嫩化的最佳条件为:酶浓度 0.07%,pH6.92,处理温度 60.00 °C,处理时间 1.84 h,此时感官评价的预测值达到最大,为 94.70 分。

2.2.4 验证实验 为检验实验的可靠性,同时方便实验操作,采用酶浓度 0.07%,pH6.9,处理温度 60 °C,处理时间 1.8 h 进行 3 次验证实验,对优化前后牛肉的品质指标进行比较,实验结果见表5。从表5 可以看出,优化前后持水率、烹饪失水率、剪切力、感官评价、硬度、弹性、内聚性、咀嚼性均有极显著差异( $p < 0.01$ ),优化后感官评价达到 94.20 分,与模型预测值(94.70 分)接近,较对照组提高了 39.56%,持水率、弹性、内聚性及咀嚼性较对照组分别提高了 28.41%、18.10%、7.31% 和 16.46%,而烹饪失水率、剪切力和硬度分别较对照组降低了 28.50%、54.50% 和 14.46%。张婷等<sup>[25]</sup>采用酶解、超声波辅助酶解、微波辅助酶解等嫩化工艺处理牛肉,发现实验组的剪切力、硬度、咀嚼性较对照组显著降低( $p < 0.05$ ),弹性、回复性无显著差异( $p > 0.05$ )。明建等<sup>[26]</sup>研究了蛋白酶嫩化处理牛肉后对其物性的影响,发现不

表4 牛肉嫩化二次多项式模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model for beef tenderness

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	1301.79	14	92.98	23.28	<0.0001	**
A	147.70	1	147.70	36.97	<0.0001	**
B	244.80	1	244.80	61.28	<0.0001	**
C	0.75	1	0.75	0.19	0.6725	
D	6.90	1	6.90	1.73	0.2133	
AB	34.81	1	34.81	8.71	0.0121	*
AC	65.61	1	65.61	16.42	0.0016	**
AD	55.50	1	55.50	13.89	0.0029	**
BC	131.10	1	131.10	32.82	<0.0001	**
BD	14.82	1	14.82	3.71	0.0781	
CD	8.12	1	8.12	2.03	0.1794	
A <sup>2</sup>	391.02	1	391.02	97.88	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	253.92	1	253.92	63.56	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	0.27	1	0.27	0.068	0.7993	
D <sup>2</sup>	120.97	1	120.97	30.28	0.0001	**
残差	47.94	12	3.99			
失拟项	47.25	10	4.73	13.76	0.0696	
纯误差	0.69	2	0.34			
总和	1349.73	26				

注: \*\* 表示差异极显著 ( $p < 0.01$ ), \* 表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

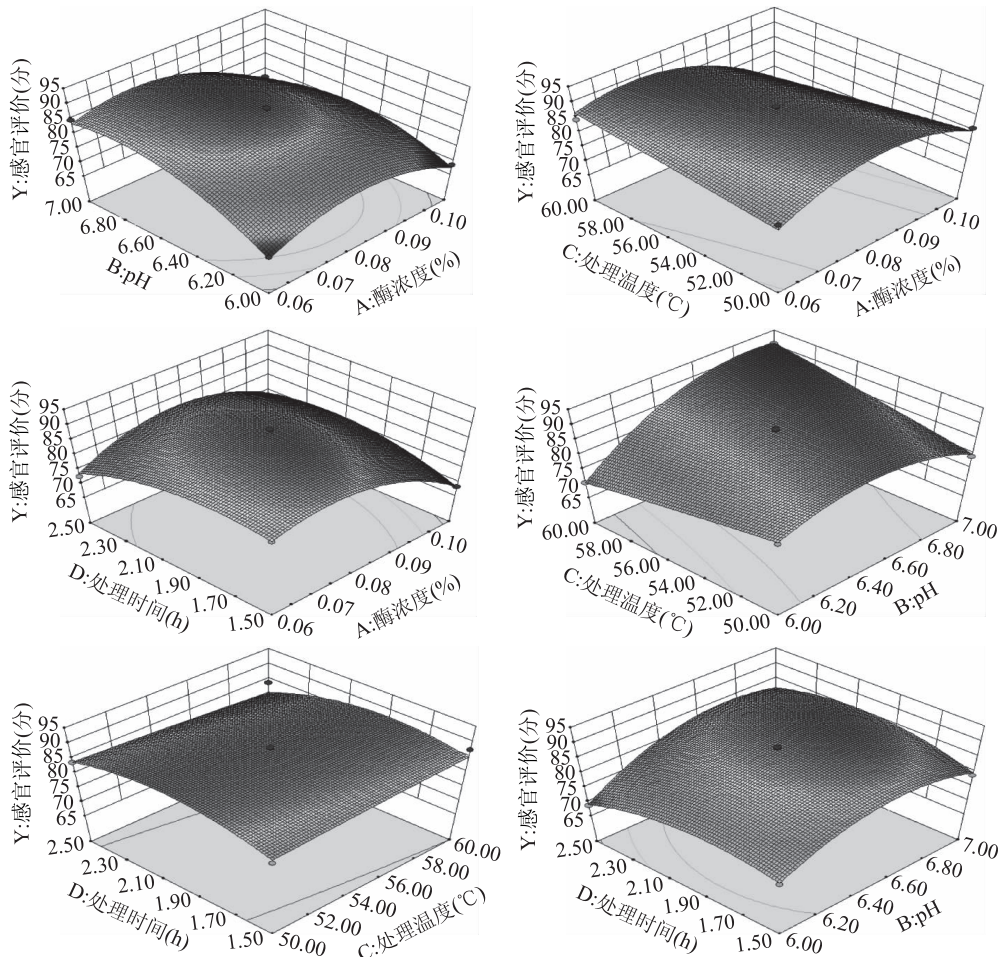


图5 各因素交互效应对感官评价的响应面图

Fig.5 Response surface curve of sensory evaluation affected by two-factor interactions

表5 优化前后牛肉的品质变化  
Table 5 Quality changes of beef before and after optimization

组别	持水率(%)	烹饪失水率(%)	剪切力(N)	感官评价(分)
对照组	49.94 ± 3.29	46.32 ± 3.14	47.23 ± 2.06	67.50 ± 0.66
优化后	64.13 ± 2.31 **	33.12 ± 2.58 **	21.49 ± 1.35 **	94.20 ± 1.25 **
组别	硬度(g)	弹性	内聚性	咀嚼性
对照组	3416.10 ± 129.33	2.32 ± 0.17	0.41 ± 0.0021	1406.02 ± 132.43
优化后	2922.20 ± 109.51 **	2.74 ± 0.15 **	0.44 ± 0.0014 **	1637.41 ± 127.56 **

注:与对照组比较,\*\*表示差异极显著( $p < 0.01$ ),\*表示差异显著( $p < 0.05$ );表6同。

同蛋白酶处理后持水力较对照组显著提高,而失水率、剪切力、咀嚼性、弹性等指标较对照组显著降低。本研究结果与张婷及明建有相同之处,但是对于咀嚼性、弹性、回复力也有一些差异,造成这些结果差异可能与牛肉的品种及部位、酶的纯度及活性、肉样本身品质、处理条件等因素有关。可以看出,优化后的牛肉食用品质显著提高,证明该模型可以用于很好的描述牛肉嫩化工艺。

### 2.3 木瓜蛋白酶嫩化牛肉的肌纤维结构及小片化变化

肌纤维是构成肌肉的基本单位,其密度越大、直径越小表明牛肉的肉质越嫩;而肌原纤维小片化指数(MFI值)是衡量肌原纤维分解程度的指标,其值越大表明内部结构破坏越多。木瓜蛋白酶嫩化牛肉肌纤维结构及MFI值如表6所示。

表6 木瓜蛋白酶嫩化牛肉肌纤维结构及MFI值  
Table 6 Effect of the papain on the characteristics of beef myofibrils and MFI values

组别	MFI值	肌纤维密度 (n/mm <sup>2</sup> )	肌纤维直径 (μm)
对照组	37.50 ± 1.74	283.27 ± 13.43	46.87 ± 2.15
优化后	65.60 ± 2.26 **	342.63 ± 15.88 **	32.86 ± 2.54 **

由表6可以看出,使用木瓜蛋白酶对牛肉进行处理,可以极显著( $p < 0.01$ )增加牛肉的肌纤维密度及MFI值,并降低肌纤维直径,这与施帅等<sup>[8]</sup>的研究结果一致。优化后MFI值和肌纤维密度分别增加74.93%和20.96%,而肌纤维直径降低29.89%。这可能是由于木瓜蛋白酶处理可以催化部分肌纤维的蛋白质降解成较小的蛋白分子或多肽段,促进了肌纤维的小片化及肌纤维直径的减小,肌纤维密度相应增加。

### 3 结论

本研究采用单因素实验和响应面法对木瓜蛋白酶嫩化牛肉的工艺进行优化。得到的响应面模型效果极显著( $p < 0.0001$ ),得到最佳工艺条件为:酶浓度0.07%,pH6.9,处理温度60℃,处理时间1.8h。通过实验验证,牛肉的食用品质在优化后显著提高( $p < 0.01$ ),其感官评价为94.20分,较对照组提高了39.56%,而剪切力为21.49N,较对照组降低了54.50%。可见,本研究构建的模型准确可靠,与实验拟合良好。初步机理研究发现木瓜蛋白酶可以促进牛肉肌纤维的小片化,使牛肉肌纤维直径减小,密度增

加,从而使牛肉嫩度提高。本研究使其牛肉食用品质得到显著提高,为其生产加工提供一定的理论依据。

### 参考文献

[1] Ha M, Bekhit E D A, Hopkins D L. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins [J]. Food Chemistry, 2012, 134(1): 95-105.

[2] 陶瑞. 烧烤用原料牛肉调理嫩化条件与品质评价研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.

[3] 聂远洋, 李璐, 温文婷, 等. 牛肉的外源性蛋白酶嫩化技术研究进展[J]. 肉类研究, 2013(6): 44-48.

[4] Daniela I, Camelia V, Felicia D. Influence of thermic treatment on technological characteristics of adult beef meat tenderized with bromelin [C]. The 6th edition of Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, COFrRoCA. Orléans, France: 2010: 7-10.

[5] 金惠玉, 张筠, 王欢欢. 木瓜蛋白酶对牛肉干嫩化的影响[J]. 中国调味品, 2013, 38(8): 26-29, 33.

[6] Kwang-Il K, Sang-Yoon L, Soo-Jin K, et al. Effects on the Qualities of Proteolysis to Beef by Non-coating and Coating Protease Treatment [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2016, 36(1): 114.

[7] Suryati T, Arief I I, Polii B N. Tenderness and Cooking Loss of Yearling Brahman Cross and, Mature Ongole Cross Beef Treated Tenderizing Method [C]. Proceeding of the 2nd International Seminar on Animal Industry. Jakarta: 2012: 636-641.

[8] 李明亮. 木瓜蛋白酶的双水相分离纯化、原位固定化及其应用研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.

[9] 夏建华. 蛋白酶的保健应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(7): 1990-1996.

[10] 赵立, 陈军, 李苗云, 等. 木瓜蛋白酶嫩化鸭肉效果的研究[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(6): 41-46.

[11] 肖夏, 李洪军, 贺雅非. 三峡库区牛肉复合酶快速嫩化技术[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(4): 114-122.

[12] 林志民, 游立怡. 几种牛肉嫩化方法的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(7): 127-129.

[13] 李丽杰, 杨志华. 木瓜蛋白酶嫩化鹿肉方法的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 216-219.

[14] 夏建军, 李洪军, 耿铁柱, 等. 响应面法优化酶嫩化牛肉工艺[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(12): 17-24.

[15] 陶瑞, 汤晓艳, 龚艳, 等. 响应面法优化木瓜蛋白酶-复合磷酸盐嫩化低档部位牛肉工艺[J]. 食品科学, 2016, 37(20):

(下转第97页)

### 3 结论

通过五种酶的筛选,采用碱性蛋白酶水解制备蚕蛹蛋白肽,通过单因素和响应面实验确定蚕蛹蛋白肽酶解的最佳工艺条件为:酶解温度 55 ℃,加酶量 6%,酶解时间 2 h, pH8,水和底物比 20:1,此条件下水解度为 19.96% ± 1.02%,免疫活性 OD<sub>490</sub> 为 0.2512 ± 0.0125。酶解可将蚕蛹蛋白分解成小肽段,可能大量破坏其结合表位,既能降低过敏的风险,又能获得活性肽。因此,实验对蚕蛹蛋白的酶解条件对潜在致敏性的研究有重要意义,同时给低致敏蚕蛹口服液提供一定的理论依据。本文以得到的酶解结果进行了蚕蛹免疫活性蛋白肽口服液的研制,得到最佳工艺为:蔗糖量 8%,柠檬酸量 1%,在此条件制得的口服液口味最佳。这也为特需人群提供了一定的营养价值。

### 参考文献

- [1] 吕秋楠,史高峰,陈学福,等.脱脂蚕蛹酸水解制备复合氨基酸的工艺研究[J].食品科技,2009(10):86-88.
- [2] 梁贵秋,周晓玲,陆春霞,等.不同蚕蛹的营养成分分析[J].食品工业,2013(12):236-238.
- [3] 金维维,赵钟兴,刘旭辉,等.蚕蛹蛋白氨基酸含量的高效液相色谱法测定[J].时珍国医国药,2010,21(3):537-539.
- [4] 刘倪琪.蚕蛹肽的制备以及功能活性的研究[D].山东:山东农业大学,2013.
- [5] Zhou J, Han D. Safety evaluation of protein of silkworm (*Antheraea pernyi*) pupae [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006,44(7):1123-1130.
- [6] Zhou J, Sun X, Xu H, et al. Research progress on silkworm pupae [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 1996,18(1):38-40.
- [7] 陈静,郑明珠,王浩.蚕蛹蛋白肽的制备及其运动饮料研制[J].食品科学,2009(14):318-320.
- [8] Mattison C P, Grimm C C, Wasserman R L. *In vitro* digestion of soluble cashew proteins and characterization of surviving IgE-reactive peptides [J]. Molecular Nutrition and Food Research,
- (上接第 91 页)
- 13-18.
- [16] 孙国梁.生姜蛋白酶的提取及其在牛肉嫩化中的应用研究[D].泰安:山东农业大学,2008.
- [17] NY/T 1180-2006,肉嫩度的测定、剪切力的测定法[S].
- [18] GB/T 16291.1-2012 感官分析选拔、培训与管理评价员一般导则[S].
- [19] 韩冬洁,包高良,刘亚娜,等.模糊综合评判法在牦牛肉感官评定中的应用[J].食品工业科技,2016,37(15):283-286.
- [20] 孟祥忍,王恒鹏,杨章平.不同熟制度牛肉的品质变化研究[J].食品工业科技,2015,36(10):101-104,109.
- [21] 罗亚兰,张玉斌,余群力,等.超临界 CO<sub>2</sub> 处理对鲜牛肉灭菌效果及食用品质的影响[J].食品工业科技,2017,38(4):

2014,58(4):884-893.

- [9] 余华.高营养蚕蛹复合氨基酸液的研制[J].粮油食品科技,2000,8(4):18.
- [10] Hu D, Liu Q, Cui H, et al. Effects of amino acids from selenium-rich silkworm pupas on human hepatoma cells [J]. Life Science, 2005,77(17):2098-2110.
- [11] 杨安树,陈红兵,郑功源,等.酶法水解蚕蛹蛋白制备免疫活性肽工艺的研究[J].食品工业科技,2008,29(1):225-227.
- [12] 蔡丽丽,陆启玉,钱林.酶法改性食品蛋白质的研究进展[J].粮油加工与食品机械,2006(6):85-87.
- [13] 徐家玉,吕晓华.蚕蛹蛋白缓解运动性疲劳的实验研究[J].现代预防医学,2008,35(12):2309-2311.
- [14] 王伟,何国庆,金英哲,等.蚕蛹蛋白的综合利用现状分析和开发前景展望[J].食品与发酵工业,2006,32(9):112-115.
- [15] Church F C, Swaisgood H E, Porter D H, et al. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins I [J]. Journal Dairy Science, 1983,66(6):1219-1227.
- [16] 王艳,龙彩云,夏佳恒,等.不同酶水解对鸡蛋清蛋白降解和潜在致敏性的影响[J].食品工业科技,2016(10):34.
- [17] 鲍英存,张李峰,程卫东,等.含红芪与含黄芪玉屏风散含药血清对老龄小鼠脾淋巴细胞增殖和抗衰老作用的比较研究[J].中药药理与临床,2012,28(4):3-7.
- [18] 朱科学,聂少平,李文娟,等.黑灵芝多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱生细胞因子的影响[J].食品科学,2010(19):351-354.
- [19] 刘旭辉.蚕蛹蛋白质酶解制备蚕蛹活性肽的研究[D].广西:广西大学,2012.
- [20] 金文刚,吴海涛,朱蓓薇,等.响应面优化虾夷扇贝生殖腺多肽-Ca<sup>2+</sup>螯合物制备工艺[J].食品科学,2013,34(16):11-16.
- [21] 赵鸿霞,朱蓓薇,周大勇,等.响应面法优化牡蛎酶解工艺[J].大连工业大学学报,2010,29(6):421-425.
- 236-241.
- [22] 武军,刘熙,邹尔新.宰后成熟对牛肉肌组织结构及食用品质的影响[J].中国兽医学报,2002,22(5):494-496.
- [23] Olsson G, Parrish F C, Stromer M H. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage [J]. Journal of Food Science, 1976,41(5):1036-1041.
- [24] 王海丽,隋苗苗,崔明勋,等.软枣猕猴桃粗蛋白酶嫩化牛肉工艺优化及其嫩化机制[J].肉类研究,2013(7):14-19.
- [25] 张婷,刘永峰,翟希川,等.牛肉粒的嫩化及其品质评价[J].食品与发酵工业,2015,41(11):169-175.
- [26] 明建,李洪军.不同酶嫩化处理对牛肉物性的影响[J].食品科学,2008,29(12):156-159.