

重组猪肉脂肪酶对不同肉品风味的影响

肖 晗, 张 振, 于小磊, 王 成, 孟 鑫*
(锦州医科大学食品科学与工程学院, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 以重组质粒pET-LPL为模板进行PCR扩增, 双酶切扩增产物和质粒载体pESC-His-BtS1-Erg20后连接, 并转化至酿酒酵母感受态细胞中, 构建真核表达载体pESC-His-BtS1-Erg20-LPL, 获得重组菌株XH1。通过电子鼻和气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)检测重组猪肉脂肪酶对猪肉、鸡肉和鸭肉等典型肉品风味的影响。电子鼻检测结果表明, 经重组脂肪酶处理后的3种肉品中, 硫化物、氮氧化合物、芳香物质含量显著增加。GC-MS检测经重组脂肪酶处理后猪肉、鸡肉和鸭肉肉品中羰基类化合物含量与空白组羰基类化合物含量分别为63.79%和68.89%、9.9%和30.21%、23.78%和27.11%; 2-正戊基呋喃相对含量分别为1.70%和2.23%、0.16%和3.96%、1.28%和2.21%。经重组酶处理后肉品挥发性物质显著高于空白对照, 这表明重组脂肪酶能有效改善肉品原有风味, 是一种优质的风味酶资源。

关键词: 重组脂肪酶; 电子鼻; GC-MS; 风味

中图分类号: TS 251.1 文献标志码: A 文章编号: 1005-9989(2021)02-0097-06

DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2021.02.016

Effect of Recombinant Pork Lipase on Different Meat Flavors

XIAO Han, ZHANG Zhen, YU Xiaolei, WANG Cheng, MENG Xin*

(College of Food Science and Engineering, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

Abstract: In this paper, the recombinant plasmid pET-LPL was used as a template for PCR amplification, the amplified product was double-enzyme digested and the plasmid vector pESC-His-BtS1-Erg20 was ligated and transformed into competent cells of *Saccharomyces cerevisiae* to construct the eukaryotic expression vector pESC-His-BtS1-Erg20-LPL, to obtain recombinant strain XH1. The electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used to detect the effect of recombinant pork lipase on typical meat flavors such as pork, chicken and duck. The results of the electronic nose test showed that the contents of sulfide, nitrogen oxides, and aromatic substances in the three meat products treated with recombinant lipase increased significantly. GC-MS detected the content of carbonyl compounds in pork, chicken and duck meat after recombinant lipase treatment and the content of carbonyl compounds in the blank group were 63.79% and 68.89%, 9.9% and 30.21%, 23.78% and 27.11%, respectively; The relative

收稿日期: 2020-09-18

*通信作者

基金项目: 国家级大学生创新课题(201710160000194); 辽宁省自然科学基金项目(20180550487)。

作者简介: 肖晗(1996—), 硕士研究生。

contents of 2-n-pentyl baran were 1.70% and 2.23%, 0.16% and 3.96%, 1.28% and 2.21%, respectively, which were significantly higher than the blank control, indicating that recombinant lipase can effectively improve the original flavor of meat. It is a high-quality flavor enzyme resource.

Key words: recombinant lipase; electronic nose; GC-MS; flavor

目前,在肉品生产中存在较多使用食品添加剂如调味料和香精增强香味的状况,但添加剂过多会导致营养物质被破坏^[1]。肉品的食用品质是消费者选择肉类的因素之一,熟肉的食用品质由其嫩度、多汁性和风味决定,尤其是肉品风味^[2]。为此,寻找一种既不破坏肉品营养物质又能提高肉品风味的方法是未来食品加工的发展方向。近年来,为保证食品安全,国内外大力倡导从动物或植物中提取制得酶制剂应用于食品加工生产^[3]。HEWITT E J等^[4]在1956年首次定义了风味酶概念,并阐明了风味酶在水果和蔬菜风味形成中发挥的作用。目前,已有通过在肉品中添加风味酶制剂以改善肉品风味的研究^[1],如脂肪酶、蛋白酶等,尤其是脂肪酶的研究引起了学者的关注^[5]。脂肪酶(Lipase, EC 3.1.1.3)即甘油酯水解酶^[6],水解脂肪后可产生短链脂肪酸、二乙酰、酯类等风味前体物质,能有效改善食品风味,广泛应用在食品生产与加工中。已有研究表明在原料肉中添加脂肪酶可赋予肉品独特风味^[7]。如封莉等^[8]研究发现添加适量的脂肪酶可促进中式香肠的脂肪氧化,释放出更多风味物质,提高了产品感官品质。

本实验室前期研究表明猪肉内源性脂肪酶对肉品及乳制品的风味均有所改善,并通过基因重组技术,将猪肉脂肪酶基因成功导入到大肠杆菌中,一定程度上改善了肉品风味^[9-10]。为更好地满足食品生产需求,本研究将猪肉脂肪酶(胰蛋白脂肪酶LPL)基因在酿酒酵母中表达,采用电子鼻结合气相色谱质谱联用技术探究脂肪酶在猪肉、鸡肉和鸭肉等典型原料肉品风味中的作用,以期获得优质、高产食品级脂肪酶的重组菌株。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

猪肥肉、鸡胸肉、鸭腿肉:市售;YPD培养基:天津市科密欧化学试剂公司;pESC-His-BtS1-Erg20载体、酿酒酵母菌株:锦州医科大学实验室。

1.2 主要仪器与设备

PCR仪:德国Eppendorf公司;Tanon 2500R凝胶成像分析系统:上海天能公司;台式低速离心机:美国Sigma公司;EC250电泳槽及电泳仪:美国EC公司;PEN3型电子鼻:德国AIRSENSE公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物的设计与合成

1.3.2 LPL基因的扩增 以实验室前期构建好的重组质粒pET-LPL为模板进行PCR扩增,PCR体系25 μ L:质粒模板1.0 μ L, dNTP 2.0 μ L, 10 \times buffer 2.5 μ L。上、下游引物各0.5 μ L, Taq酶0.5 μ L, ddH₂O 18 μ L。扩增条件:94 $^{\circ}$ C预变性4 min; 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 60 $^{\circ}$ C退火50 s, 72 $^{\circ}$ C延伸110 s, 72 $^{\circ}$ C延伸7 min(共35次循环);得到的产物在1%琼脂糖凝胶中进行电泳检测后纯化回收。

1.3.3 真核表达载体的构建和鉴定 将PCR产物和pESC-His-BtS1-Erg20载体均使用BamH I和Sal I双酶切,参考王雅楠^[11]的方法连接,转化酿酒酵母感受态细胞,挑取阳性克隆后提取质粒,进行酶切及双酶切鉴定,将经鉴定符合条件的重组质粒送至生物公司测序。

1.3.4 重组菌株的诱导表达 取冻存菌株划线培养,挑单菌落摇菌接种至SD-his液体培养基中,在30 $^{\circ}$ C条件下培养24 h。离心后用无菌水洗净菌体中葡萄糖,接种至SD-HIS-URA液体培养基中,在30 $^{\circ}$ C恒温培养箱中振荡培养,进行诱导表达。

1.3.5 重组脂肪酶的制备及活性测定 阳性转化子经过SD-HIS-URA诱导培养后,5000 r/min离心5 min后收集菌体,用超声波破碎仪300 W、超声4 s,间隔4 s,破碎20 min后4 $^{\circ}$ C、1000 r/min离心10 min,取上清即为重组酶液,纯化后置于-20 $^{\circ}$ C贮存备用。脂肪酶采用改进的铜皂法测定,在714 nm波长下测定上清液OD值,根据标准曲线得到重组脂肪酶酶活力^[12]。酶活力单位(U):1 min转化出1 μ mol脂肪酸的量称为1个脂肪酶活力单位。

1.3.6 感官评定 聘请10名食品专业工作者作为感官评定员(5男5女),经专业培训后,对每组肉品进行感官综合评价,评分标准见表1^[9]。



表1 感官评分标准

项目	评分标准	分数
外观 (20分)	内容物呈本色或淡粉红色， 表面呈加工后应有色泽	15~20
	内容物呈玫瑰红色，表面呈一定颜色	5~15
	内容物呈深红色或黄色， 表面暗淡无色泽	0~5
气味 (30分)	猪肉香味浓郁	20~30
	猪肉香味明显	15~20
	猪肉香味正常	0~15
质地 (20分)	质地紧密并且富有弹性	10~20
	质地较软，弹性小	5~10
	质地较硬，无弹性	0~5
风味 (40分)	具有经处理后猪肉正常的香味， 无异味	30~40
	稍有异味，风味不适	15~30
	有异味，风味严重不适	0~15

1.3.7 电子鼻检测挥发性物质 在常温下，取重组酶液10 mL，分别与10 g猪肉样品、10 g鸡肉样品、10 g鸭肉样品充分作用30 min，作为处理组；以双蒸水作为空白组，分别在350 mL沸水中煮3 min后备用。分别将6组样品取5 g切碎放入试管中，密封后进行测量。电子鼻检测时间为50 s，清洗时间为120 s。每个样品重复测定3次。PEN3型便携式电子鼻电子性能及参数^[13]描述见表2。

表2 PEN3型便携式电子鼻传感器性能及参数描述

阵列 序号	传感器 名称	传感器表 示符号	性能描述	灵敏物质及阈 值/(mL/cm ³)
1	W1C	R(1)	芳香成分	甲苯, 10
2	W5S	R(2)	灵敏度高，对氮氧化合 物很敏感	二氧化氮, 1
3	W3C	R(3)	氨水，对芳香成分灵敏	苯, 10
4	W6S	R(4)	主要对氨气有选择性	氨气, 100
5	W5C	R(5)	烷烃，芳香成分	丙烷, 1
6	W1S	R(6)	对甲烷灵敏	甲烷, 100
7	W1W	R(7)	对硫化物灵敏	硫化氢, 1
8	W2S	R(8)	对乙醇灵敏	一氧化碳, 100
9	W2W	R(9)	对芳香成分，含硫有机 化物灵敏	硫化氢, 1
10	W3S	R(10)	对烷烃灵敏	甲烷, 10

1.3.8 GC-MS检测 固相微萃取：将研磨后的猪肉、鸡肉、鸭肉分别取5 g迅速放入样品瓶中，分别加入3 mL饱和氯化钠溶液及磁转子并加盖密封，于磁力搅拌器45 °C中加热10 min，插入萃取头吸附30 min，取下萃取头在GC进样口解吸5

min。每个样品重复实验3次。

气相色谱条件：整个模式采用不分流进样；利用HP-5MS毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)进行挥发性化合物的分离；载气为氦气，流速1.0 mL/min；升温程序：起始柱温40 °C保持3 min，以3 °C/min升温到100 °C，然后以5 °C/min升温到230 °C，保持5 min^[10]。

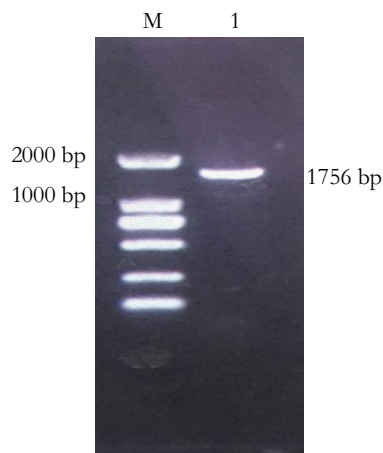
质谱条件：离子源温度230 °C，四级杆温度150 °C；电子电离源；电子能量70 eV；质量扫描范围m/z 30~550。

1.3.9 数据处理 数据统计利用SPSS 22.0版本对实验数据进行ANOVA单因素方差分析和LSD多重检验(P<0.05)GC-MS数据分析：挥发性成分通过谱库检索进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增结果

以重组质粒pET-LPL为模板，P1和P2为引物进行PCR扩增。由图1可知，已成功扩增出长度为1756 bp的LPL基因，与预期结果一致，可进行后续实验。

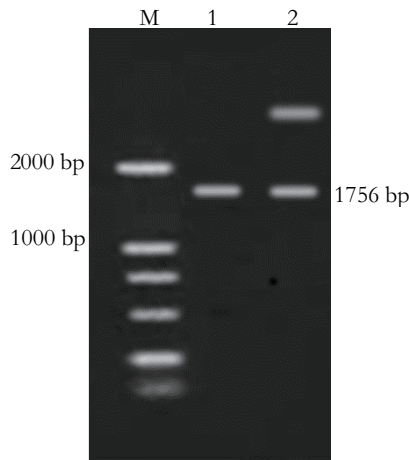


注：M：Marker，1：PCR扩增结果。

图1 猪LPL基因扩增结果

2.2 重组质粒pESC-His-BtS1-Erg20-LPL的鉴定与序列分析

如图2所示，对构建的重组质粒pESC-His-BtS1-Erg20-LPL分别进行PCR鉴定、双酶切鉴定和测序鉴定，得到大小为1756 bp的片段，与预期结果相符。将目的基因的核苷酸序列通过NCBI BLAST比对分析，结果与NCBI公布的猪肉LPL(序列号XM_021072174.1)序列具有极高的相似性，达99.11%，这表明重组质粒构建成功。重



注：M：Marker，1：PCR扩增结果，2：重组质粒酶切鉴定。

图2 重组质粒酶切鉴定和PCR鉴定

细菌经发酵后，测定重组酶活力为0.917 U/mL，分子质量约为53.58 ku，等电点为8.72。

2.3 肉品感官评定分析

猪肉、鸡肉和鸭肉的感官评定结果如图3所示，经重组脂肪酶处理后的3种肉品感官评分均高于未经重组脂肪酶处理的3种肉品，且具有显著性差异($P < 0.05$)，初步发现重组脂肪酶可以改善肉品气味，提高肉品感官品质。

2.4 电子鼻检测重组脂肪酶对肉品风味的影响

经重组酶处理后的3种样品及空白组的传感器响应变化曲线如图4所示，在3种样品中添加适当

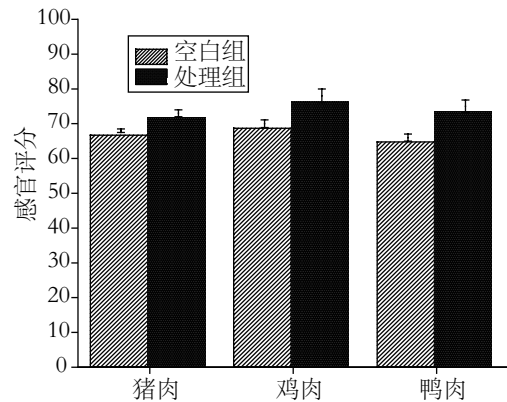
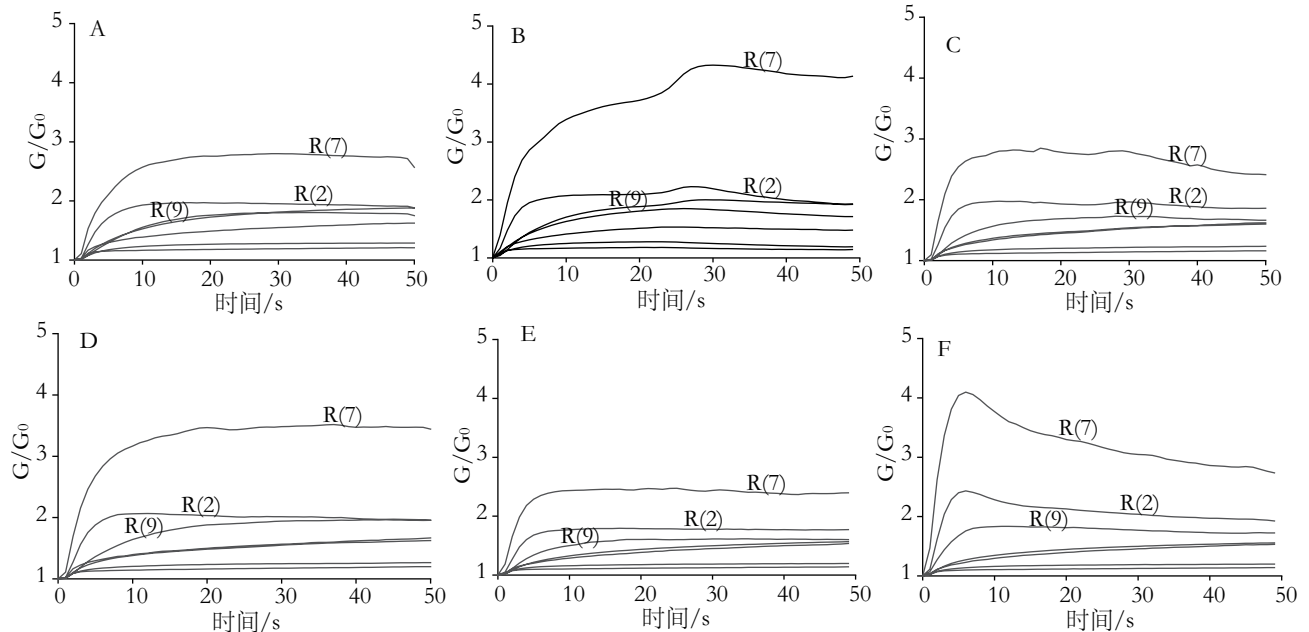


图3 猪肉、鸡肉、鸭肉经脂肪酶处理前后感官综合评分

比例重组脂肪酶后，与空白组相比，样品中挥发性风味物质的种类无变化，但部分物质含量有一定程度的变化。其中，出现较大波动的传感器有R(7)、R(2)、R(9)，即样品中的硫化物、氮氧化物、芳香族化合物含量显著增加($P < 0.05$)，而这些化合物是影响肉品风味的主要物质。因此，在猪肉、鸭肉和鸡肉等肉品中添加重组脂肪酶能够有效改善原有风味。

2.5 GC-MS 检测肉品挥发性物质

通过SPME-GC-MS检测重组脂肪酶对猪肉、鸡肉、鸭肉风味的影响，分别检测出挥发性物质62、51和66种，主要包括醛类、烃类、芳香族类、酯类、醇类和含硫化合物等。从重组脂肪酶处理前后3种肉类样品中各类挥发性物质成分总峰



注：A、C、E分别为猪肉、鸡肉、鸭肉空白组(未经任何处理组)；B、D、F分别为猪肉、鸡肉鸭肉处理组(添加重组酶液组)。

图4 猪肉、鸡肉、鸭肉经脂肪酶处理前后传感器响应变化曲线

面积的变化中能够看出(如图4),电子鼻对经重组脂肪酶处理后的肉品风味有明显响应,空白组与处理组相比,猪肉、鸡肉、鸭肉经重组脂肪酶处理前后,肉品挥发性化合物种类和含量均发生改变,且响应值各不相同,醛类、芳香族化合物与含硫化合物含量显著增加($P<0.05$),有机酸类和烃类物质含量明显降低。

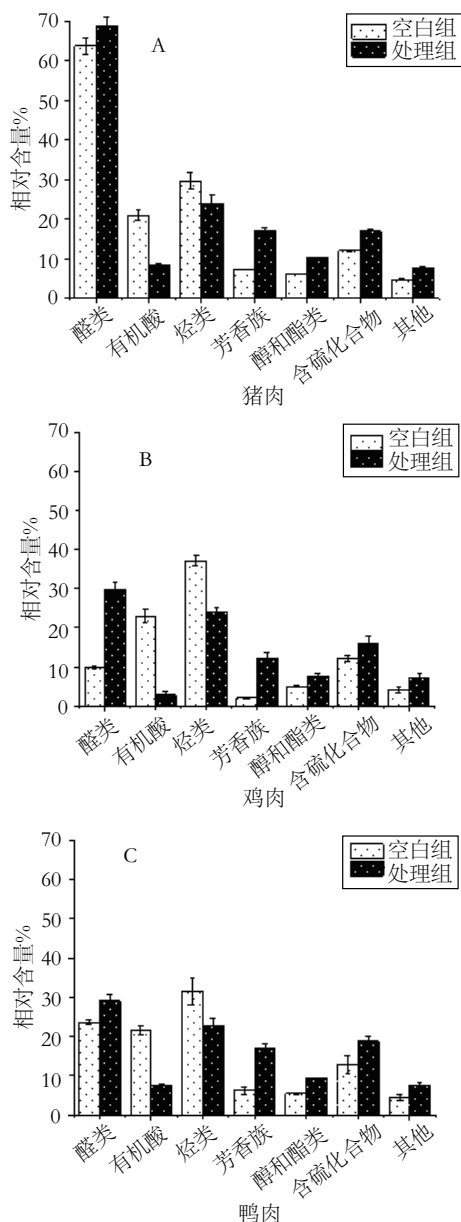
2.5.1 羰基类化合物 醛类化合物属于羰基化合物的一种,是肉品风味形成和挥发物的主要成分^[14],尤其是 $C_6\sim C_{10}$ 的醛类可以有效提高肉品风味。醛类具有特殊香气,经常作为香料添加

到食品中,尤其是正己醛,具有清香的青草气味,对肉品整体风味影响显著。图5A未经重组脂肪酶处理的猪肉空白组与经重组脂肪酶处理的处理组醛类化合物的相对含量分别为 $(63.79\pm 2.1)\%$ 和 $(68.89\pm 2.31)\%$,这表明重组脂肪酶促进了挥发物成分的增加,改善了猪肉风味;图5B鸡肉空白组与处理组中醛类化合物的相对含量为分别为 $(9.9\pm 0.13)\%$ 和 $(30.21\pm 0.62)\%$ 。表明经重组脂肪酶作用后的鸡肉风味化合物成分增加;图5C鸭肉空白组与处理组中醛类化合物的相对含量为 $(23.78\pm 0.64)\%$ 和 $(27.11\pm 1.66)\%$,这表明经重组脂肪酶作用后的鸭肉风味化合物成分增加。结果表明,肉品经重组脂肪酶作用后,风味物质增加且具有显著性差异($P<0.05$),很大程度上提高了肉类物质的香气。

2.5.2 芳香族类化合物 芳香族化合物对肉品香气起很大的作用,有一些芳香烃的风味较为浓郁^[15],可能是提高整体风味质量的主要化合物^[16],如在样品中检测出的甲苯、苯甲醛、4-溴亚苄基氨基-1-溴苯等芳香族类化合物,经重组脂肪酶处理后较处理前,相对含量均有显著性差异($P<0.05$),在风味研究中认为它们对形成肉香味具有不可忽视的作用。

2.5.3 醇类和酯类 脂肪酸降解所产生的物质以及氧化分解的脂肪可以得到醇类物质。醇类分为短链醇和长链醇,阈值较低的醇类尤其是长链醇,可以很大程度改变肉品风味^[17]。酯类化合物同样影响着风味,大多数具有蜜香果香香气,对风味起到润和作用^[18]。如丁酸乙酯和碳酸二异硫氰酸单异丙酯。图5可知醇类和酯类经脂肪酶处理后相对含量发生变化,重组脂肪酶作用后肉品的醇类和酯类有不同程度地增加且具有显著性差异($P<0.05$)。酯类物质虽不能赋予决定性气味,但可以很大程度上为肉品风味做出贡献。经重组脂肪酶处理后,醇类和酯类物质含量的变化可能是肉品产生香气的原因之一。

2.5.4 含硫化合物 含硫化合物呈味阈值较低,主要来源于加工过程的美拉德反应、前体风味物质的酶促反应转化,具有特殊气味,多数具有肉香^[19],如月桂烯醇、乙醇和2-正戊基呋喃等,其中2-正戊基呋喃对肉类风味改善尤为重要^[20]。图5A猪肉空白组的2-正戊基呋喃相对含量为1.70%,处理组的2-正戊基呋喃相对含量为2.23%;图5B鸡



注: A、B、C分别为猪肉、鸡肉、鸭肉重组酶处理前后挥发性化合物的相对含量。

图5 3种肉类样品挥发性化合物的相对含量



肉空白组的2-正戊基呋喃相对含量为0.16%，处理组的2-正戊基呋喃相对含量为3.96%；图5C鸭肉空白组的2-正戊基呋喃相对含量为1.28%，处理组的2-正戊基呋喃相对含量为2.21%，以上分析表明经重组脂肪酶处理后肉品中的硫化物比例增加，有效提升了肉品香气。

3 结论

本实验成功构建了真核表达载体pESC-His-BtS1-Erg20-LPL，同时在酿酒酵母菌中得到稳定表达。通过电子鼻检测重组脂肪酶对猪肉、鸡肉和鸭肉等典型肉品风味的影响，检测出醛类化合物、硫化物、氮氧化合物、芳香族化合物含量均有所增加。通过GC-MS检测发现，肉品中挥发性成分主要有醛类、烃类、芳香族类、含硫化合物、有机酸以及醇和酯类等物质含量均有所增加，这表明重组脂肪酶可以有效提高肉品香气，改善肉品原有风味，为重组脂肪酶在肉品生产中的应用提供理论依据。

参考文献：

- [1] 李慧,陈敏,张华璠.肉品工业中的食品添加剂安全问题[J].肉类研究,2005,(12):1-3.
- [2] 陈辉,BA H V, SEO H W,等.屠宰体重显著影响猪肉品质和风味物质[J].猪业科学,2019,36(10):18-21.
- [3] 王君,罗雪云,田惠光,等.国内外食品用酶制剂管理的比较研究[J].卫生研究,2008,37(3):383-384.
- [4] HEWITT E J, MACKAY D A M, KONIGSBACHER K, et al. The role of enzymes in food flavors[J]. Food Technology,1956,10(10):487-489.
- [5] 张聪,苏扬.风味酶与风味生物技术[J].中国调味品,2014,(12):120-123.
- [6] MOHAMAD A M S, MOHD F S F, GANASEN M, et al. Structural Adaptation of Cold-Active RTX Lipase from *Pseudomonas* sp. Strain AMS8 Revealed via Homology and Molecular Dynamics Simulation Approaches[J]. Biomed Research International,2013:1-9.
- [7] 孟鑫,姚晓蕾,尚宏丽,等.应用电子鼻检测内源性脂肪酶作用猪肉风味的变化[J].食品工业科技,2016,37(5):292-297.
- [8] 封莉,邓绍林,黄明,等.脂肪酶对中式香肠脂肪降解、氧化和风味的影响[J].食品科学,2015,36(1):51-58.
- [9] 白雪.产微生物脂肪酶菌株的筛选、固定化及其应用研究[D].锦州:锦州医科大学,2018.
- [10] 杨爽.猪肉脂肪酶基因的克隆表达及其在食品中的应用研究[D].锦州:锦州医科大学,2019.
- [11] 王雅楠.兼具GPx2和ApSOD活性抗氧化酶的真核表达及活性研究[D].吉林:吉林大学,2017.
- [12] 侯爱军,徐冰斌,梁亮,等.改进铜皂-分光光度法测定脂肪酶活力[J].皮革科学与工程,2011,21(1):22-27.
- [13] 陈丽萍,徐茂琴,何红萍,等.应用PEN3型电子鼻传感器快速检测食源性致病菌[J].食品科学,2014,35(8):187-192.
- [14] 陆瑞琪.金华火腿现代工艺中脂质及风味变化[D].无锡:江南大学,2008.
- [15] ROLAND W S U, POUVREAU L, CURRAN J, et al. Flavor Aspects of Pulse Ingredients[J]. Cereal Chemistry, 2017,94(1):58-65.
- [16] 蔡宇.鸡汤中关键香气物质的鉴定及其鸡肉香精的制备[D].广州:华南理工大学,2016.
- [17] 张迪.美拉德反应改良南极磷虾酶解产物风味的研究[D].湛江:广东海洋大学,2017.
- [18] CHUNG H Y, YUNG I K S, MA W C J, et al. Analysis of volatile components in frozen and dried scallops by gas chromatography/mass spectrometry[J]. Food research international,2002,35(1):43-53.
- [19] 沙莎.白酒中挥发性含硫化合物及其风味贡献研究[D].无锡:江南大学,2017.
- [20] 陈海涛,张宁,徐晓兰,等.SPME和SDE-GC-MS分析贾永信腊羊肉挥发性风味成分[J].食品科学,2013,34(14):195-199.