

前瞻性联合研究项目
基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白
加工特性研究

公示材料汇编

项目编号: BY2014128-02

承担单位: 南京农业大学

合作企业: 扬州天歌鹅业发展有限公司

起止年限: 2014 年 7 月-2016 年 6 月

项目负责人: 徐幸莲

联系电话: 025-84395939

项目主管部门: 南京市科委

目 录

1、项目合同书-----	1
2、项目立项批文-----	12
3、验收申请表-----	13
4、工作总结报告-----	28
5、技术总结报告-----	33
6、绩效分析报告-----	113
7、经费决算表-----	117
8、合作企业项目完成情况与应用情况报告-----	119
9、相关佐证材料-----	123

江苏省科技项目合同

计划类别 产学研联合创新资金--前瞻性联合研究项目

项目编号 BY2014128-02

项目名称 基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究

项目类别 _____

起止年限 2014 年 7 月至 2016 年 6 月

项目负责人 徐幸莲

电话及手机 139510034826 025-84395939

承担单位 南京农业大学

单位地址 江苏南京卫岗 1 号 邮政编码 210095

项目主管部门 南京农业大学

江苏省科学技术厅

二〇一四年

委托单位（甲方）：江苏省科学技术厅

法定代表人：徐南平

地址：南京市北京东路 39 号

邮政编码：210008

承担单位（乙方）：

承担单位：南京农业大学

法定代表人：周光宏

地址：江苏南京卫岗 1 号 邮政编码：210095

项目负责人：徐幸莲

电话：139510034826 传真：025-84395939

电子邮件：x1xu@njau.edu.cn

保证单位（丙方、项目主管部门）：南京农业大学

法定代表人（科技局局长）：江苏南京卫岗 1 号

地址：江苏南京卫岗 1 号 邮政编码：210095

甲方批准由乙方承担省科技计划《基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究》项目的研究开发或建设任务。依据《中华人民共和国合同法》的规定，为明确甲、乙、丙三方的权利和责任，保证项目的顺利实施和科研经费的合理使用，签订本合同。

一、项目的目标和主要研究内容

要解决的主要技术难题和问题，项目研究的创新点和内容等。

要解决主要技术难题和问题：

- 1、解决鹅肝脏蛋白的安全高效提取问题。
- 2、解决鹅肝脏蛋白乳化对鹅肝脏产品质量影响控制问题。
- 3、解决鹅肝脏蛋白凝胶形成对鹅肝脏产品质量影响问题。
- 4、解决鹅肝脏产品类型单一，缺乏健康化风味型产品的问题。

项目研究的创新点和内容：

- 1、首次研究并建立高效可食用的鹅肝脏蛋白提取方法和工艺；
- 2、首次系统的从影响肝脏产品品质最重要的两个主要因素—乳化和凝胶入手研究，揭示其对产品质量的影响机制；
- 3、首次应用全蛋白质组学和分子动力学研究鹅肝蛋白的加工特性，填补国内空白。
- 4、建立依据肝蛋白加工特性的肝脏深加工产品质量控制技术；

二、项目验收内容和考核指标

包括 1、主要技术指标：如形成的专利、新技术、新产品、新装置、论文专著等数量、指标及其水平等；2、主要经济指标：如技术及产品所形成的市场规模、效益等；3、项目实施中形成的示范基地、中试线、生产线及其规模等；4、其他应考核的指标。

1. 应用蛋白质不同等电点沉淀原理，研究并建立鹅肝脏蛋白的高效可食用提取方法和工艺。 2. 结合蛋白组学和分子动力学，研究鹅肝脏蛋白乳化特性及其对肝脏产品品质影响机制。 3. 结合蛋白组学和分子动力学，研究鹅肝脏蛋白凝胶特性及其对肝脏产品品质影响机制。 4. 应用新技术、新工艺（如盐替代、预乳化、饱和脂肪的替代等），开发鹅肝脏深加工新产品。 1、高效可食用鹅肝蛋白提取方法与工艺；阐明鹅肝蛋白重要加工特性及其在加工过程中对产品质量影响机制；开发 1-2 种鹅肝新产品。 2、利用本技术，改进示范线，生产优质鹅肝产品 10000kg，新增经济效益 60 万元，利税 12 万元。 3、开发优质鹅肝新产品 1-2 个；发表论文 4-5 篇（SCI 2-3 篇）；申请发明专利 1-2 项；培养研究生 2-3 人。 4、带动我省养鹅及深加工产业的技术升级和改造，提高畜禽副产物综合利用率，提高产品品质，给企业带来较显著的经济和社会效益。

三、项目进度及考核指标

时 间	考核指标
2014 年 6 月 至 2014 年 12 月	鹅肝品质和营养成分分析, 肝蛋白提取方法建立; 培养研究生 1 人。
2015 年 1 月 至 2015 年 6 月	肝脏蛋白理化特性的研究分析. 发表文章 1 篇。 培养研究生 1 人。
2015 年 7 月 至 2015 年 12 月	肝蛋白乳化特性及机制研究, 蛋白质组学分析等; 发表文章 1-2 篇 (其中 SCI1 篇)。培养研究生 1 人。
2016 年 1 月 至 2016 年 4 月	分子动力学模拟分析; 开发新产品 1-2 种。申请发明专利 1-2 项。发表文章 2-3 篇 (其中 SCI1-2 篇)。
2016 年 5 月 至 2016 年 6 月	准备项目结题材料、验收。项目实施期间, 共生产优质鹅肝产品 10000kg, 新增经济效益 60 万元, 利税 12 万元。

四、项目承担单位、参加单位及主要研究开发人员

项目承担单位： 南京农业大学							
项目参加单位： 扬州天歌鹅业发展有限公司							
境外合作单位：						国家或地区	
项目负责人：							
姓名	性别	年龄	职称	职务	从事专业	为本项目 工作时间 (%)	所在单位
徐幸莲	女	52	正高		食品科学	80	南京农业大学
主要研究开发人员（不超过15人）：							
吉鉴宏	男	57	副高		管理学	60	扬州天歌鹅业发展有限公司
熊国远	男	39	副高		食品科学	90	南京农业大学
王 鹏	男	35	副高		食品科学	30	南京农业大学
李春保	男	36	副高		食品科学	20	南京农业大学
邓紹林	男	28	中级		食品科学	30	南京农业大学
韩敏义	男	39	中级		食品科学	30	南京农业大学
白 云	女	30	中级		食品科学	40	南京农业大学
张 勇	男	42	中级		经济学	40	扬州天歌鹅业发展有限公司
包 庆	女	49	副高		食品科学	40	扬州天歌鹅业发展有限公司
朱春兰	女	48	中级		食品科学	40	扬州天歌鹅业发展有限公司

五、项目经费预算

(一) 项目经费来源预算 经费单位: 万元

	合计	2014 年	2015 年	2016 年	备注
合计	100	100	0		
1、省拨款	15	15	0		
2、部门、地方配套	0				
3、承担单位自筹	85	85			
4、其他来源	0				

(二) 项目经费支出预算

经费单位: 万元

	预算数	其中: 省拨款	备注
(一) 直接费用	80	12.9	
1、设备费	6	0.5	
(1) 购置设备费	6	0.5	小型设备更新, 仪器设备升级维护
(2) 自制设备费	0	0	
(3) 设备改造与租赁费	0	0	
2、材料费	35	4.5	购置鹅、鹅肝、试验试剂、加工辅料等
3、测试化验加工费	15	1.5	质谱鉴定、电镜、脂肪酸、氨基酸等
4、燃料动力费	12		
5、差旅费	2	1.8	调研、采样、送检样等
6、会议费	1	1.5	参加相关学术会议5人次
7、国际合作与交流费	0	0	
8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0	1.6	申报发明专利2个、发表论文3篇版面费
9、劳务费	8	1.5	研究生试验劳务费、临时试验人员工资
10、专家咨询费	0		

11、其他支出	1		
(二)间接费用	5	2.1	其中管理费0.6万元
其中：绩效支出	2	1.2	
合计	85	15	

六、其他条款

(一) 缔约各方的权利、义务

第一条 缔约各方均应共同遵守国家、省有关科技计划与经费管理的规定，严格遵守并认真履行本合同的各项条款。

甲方应按合同约定的金额提供项目研究开发经费，有权监督、检查合同履行情况。合同履行期间，甲方有权直接组织或委托丙方检查、监督乙方对本合同的履行情况。乙方完成项目研究开发任务后，由甲方负责进行验收。

乙方应严格履行合同义务，为项目实施提供承诺的技术与条件保障，以及财务管理、成果管理、科技档案管理服务合同约定的其他义务。乙方应加强项目实施成果的转化，自项目验收后一年内未实施转化的项目，甲方有权责成乙方将成果交省内技术产权交易机构挂牌转让。

丙方应按合同约定的金额提供项目配套经费，并进行相关的协调和监督。

第二条 甲方有权根据乙方项目计划进度完成情况决定是否拨付后续经费。乙方使用项目经费应按照合同约定的支出范围执行，保证专款专用，并实行单独核算，严禁弄虚作假、截留和挪用项目经费等违反财经纪律的行为。

第三条 甲、乙、丙各方对项目合同及其他技术资料负有保密责任。

(二) 违约责任

第四条 甲方未能按合同约定的经费数提供经费，导致乙方研究开发工作延误的，应允许合同规定的研究开发工作完成期限相应顺延。

第五条 因乙方原因，导致研究开发工作未能达到合同约定指标的，乙方应采取措施尽快使项目达到合同预定要求，并承担由此而增加的费用。

第六条 乙方无正当理由未履行合同时，甲方有权停拨、追缴部分或全部省拨经费，由此造成的经济损失由乙方承担。

第七条 乙方违反经费使用规定或经甲方检查确认计划进度不符合合同约定的，甲方有权减拨或停拨后续经费；情节严重的，甲方有权终止合同，乙方应返还甲方已拨付的全部经费。

第八条 乙方因不可抗力不能履行合同义务时，可以免除违约责任，但应及时通知甲、丙方，并在合理的期限内出具因不可抗力导致合同不能履行的证明。

第九条 在履行本合同过程中，确因在现有水平和条件下难以克服的技术困难，导致研究开发部分或全部失败造成损失的，经甲方确认风险责任后，甲方在

其拨款额度范围内承担损失。

（三）合同的变更、解除和争议解决

第十条 合同的变更或解除，须经缔约各方协商一致，并签署书面文件。

第十一条 发生下列情况之一的，缔约方应当协商变更或解除合同：（1）由于不可抗力或意外事故导致合同无法履行或部分无法履行；（2）由于项目目标已被他人先行实现，有关成果已被申请专利或公开，继续履行合同已无必要；（3）由于乙方未按合同要求履行合同，或是由于其他原因，导致项目在检查或评估中被淘汰的。

第十二条 合同一方发生合并、分立或更名时，由变更后的单位继受或分别继受变更一方在合同中的权利义务。

第十三条 合同在履行过程中发生争议的，缔约各方应通过友好协商的方式解决。如协商不成时，缔约各方有权向人民法院起诉或仲裁机构申请仲裁，但在有关司法、仲裁结果生效之前，乙方有义务按照甲方要求继续履行或终止履行本合同。

（四）附 则

第十四条 项目任务书、可行性论证报告作为合同附件。项目如涉及多家（包含两家）单位参加，乙方应在签订本合同前与有关单位就合作任务和知识产权分配等问题签订有关合同或协议（仅委托其他单位进行常规试验、提供社会化科技服务和少量辅助科研工作的情况除外），同时作为本合同的附件。

第十五条 有关合同的未尽事宜，按照国家、省有关科技计划与经费管理的规定执行。

第十六条 本合同正本一式六份（甲、乙、丙方各执2份），自缔约各方签章后生效。

第十七条 本合同的解释权归甲方享有。

七、附加条款

八、签订合同各方

甲方：

法定代表人或委托代理人（签字）

项目主管处室负责人（签字）

项目主管处室经办人（签字）

公 章
年 月 日

乙方：

承担单位法定代表人或委托代理人（签字）

项目负责人（签字）

公 章
年 月 日

开户银行、帐号

丙方：

法定代表人或委托代理人（签字）

公 章
年 月 日

说明：

1、本合同适用于省基础研究、科技支撑、科技基础设施、苏北发展、国际科技合作、软科学研究等计划。

2、合同条款中所有空项都需如实填写，确无此项的，请在该栏中打“/”或在空白处写“无”。

3、乙方盖章必须是单位公章，部门章无效。



江苏省科学技术厅

江苏省科技厅科技项目信息表

<< 退出	打印项目申报材料	查看单位信息	查看项目申报书
-----------------------------	--------------------------	------------------------	-------------------------

项目概况	项目名称	基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究				
	承担单位	南京农业大学				
	计划类别	产学研联合创新资金—前瞻性联合研究项目			指南代码	无
	项目类别			起止时间	2014-07-01 至 2017-06-30	
	主管部门	南京农业大学				
	项目联系人	徐幸莲	联系人职务	院长	办公电话	025-84395939
	手机	13951034826	EMAIL	xlxu@njau.edu.cn		
项目分类	所属领域	现代农业（070000） - 农产品加工（071000） - 畜禽肉制品深加工（071002）				
	学科领域	食品科学技术（550） - 食品加工的副产品加工与利用（550.50）				

江苏省科技计划项目验收申请表

项 目 编 号：BY2014128-02

项 目 名 称：基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究

申请验收单位（盖章）：南京农业大学

申请验收日期：2017-06-26

江苏省科学技术厅

江苏省科学技术厅

二〇一六年



201467079-SBY2014020372

一、基本信息

1、项目概况

申请验收单位	项目编号	BY2014128-02			
	项目名称	基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究			
	单位名称	南京农业大学			
	单位性质	大专院校			
	主管部门	南京农业大学			
	通信地址	江苏南京卫岗1号			
	联系人	徐幸莲	联系电话	025-84395939	
	邮政编码	210095	电子信箱	xlxu@njau.edu.cn	
项目起止时间		2014-7 至 2016-6			
项目拟验收时间		2017-06-30			
验收形式		其他	验收地点	南京农业大学	
对照合同项目任务完成情况		研发任务：(1)	产业化任务：(2)	能力建设任务：(2)	
		1、超额完成； 2、完成； 3、基本完成 4、未完成 5、无			
经济社会效益情况		新增销售额 (万元)	新增利润 (万元)	新增税金 (万元)	创汇 (万美元)
		695	109.3	37.3	
		新产品 (个)	新装备(装置) (台)	新材料 (件)	新工艺 (项)
		2			1
		工程化成果 (件)	辐射推广企业 (家)	示范推广面积 (亩)	服务收入 (万元)
已申请知识产权数量 (项)		发明专利	实用新型	外观设计	软件著作权
		集成电路布图 设计专有权	动植物新品种	新药证书	药物临床批件

	医疗器械注册证	农药证书	兽药证书	国外专利
已获得知识产权数量 (项)	发明专利	实用新型	外观设计	软件著作权
	3			
	集成电路布图 设计专有权	动植物新品种	新药证书	药物临床批件
	医疗器械注册证	农药证书	兽药证书	国外专利
论著标准情况	论文总数 (篇)	核心期刊 (篇)	科学引文索引 (SCI)(篇)	工程索引(EI) (篇)
	4		4	
	科技专著 (部)	研究(咨询)报 告(份)	制定技术标准 (个)	其中:国标 (个)
人才培养情况(人)	国家杰出青年	国家优秀青年	长江学者	千人计划
	万人计划	省双创人才	省杰出青年	省优秀青年
	其他	培养研究生人数	新增就业	
		3		
研发任务承担项目及 获奖情况	科技部项目 (项)	国家基金委项目 (项)	省部级项目 (项)	其他项目 (项)
	科技部项目 拨款(万元)	国家基金委项目 拨款(万元)	省部级项目 拨款(万元)	其他项目 拨款(万元)
	国家级奖 (项)	省部级奖 (项)	市级奖 (项)	

注：相关指标请根据项目合同规定的实际情况和各类计划的特点填写，没有的填“0”。
下表由省成果转化专项资金项目填写：

产业化建设任务完成情况	形成目标产品数 (个)	新建厂房 (平方米)	改建厂房 (平方米)	新建生产线 (条)
	改建生产线(条)	新增研发设备 (台套)	新增产业化设备 (台套)	自行研制专用设备(台套)
项目完成时达到的产能				
新建与项目直接关联的研发机构数量及级别				
改建与项目直接关联的研发机构数量及级别				

2. 项目负责人情况：

姓 名	性 别	出生年月	手 机	所在工作单位
徐幸莲	女	1962-05-21	13951034826	南京农业大学
职 称	学 位	职务	证件类型	证件号码
教授	博士	院长	身份证	320113196205214862

3. 项目研究人员情况：单位：人

项目人员总数	14
其中:博士	5
硕士	3
其中:高级职称	6
中级职称	5
其中:留学归国人员	3
外籍人员	
外省人员	

在校研究生	4
其中：合作单位人员	4

4. 项目实际到位经费情况：

单位：万元

	项目 总经费	其中			
		省拨款	单位自筹	部门、地方 配套	其他来源
预算总额 (按合同自动生成)	100	15	85	0	0
已到位数	15	15	0	0	0

5. 项目经费支出情况：

单位：万元

	经费支出	其中：省拨款	备注
(一) 直接费用	13.66	13.66	
1、设备费	0.58	0.58	
(1) 设备购置费	0.58	0.58	
(2) 设备试制费	0	0	
(3) 设备改造与租赁费	0	0	
2、材料费	5.11	5.11	
3、测试化验加工费	1.5	1.5	
4、燃料动力费	0	0	
5、差旅费	3.51	3.51	
6、会议费	0	0	
7、国际合作与交流费	0	0	
8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.47	1.47	
9、劳务费	1.5	1.5	
10、专家咨询费	0	0	

11、其他支出	0	0	
(二) 间接费用	0.75	0.75	
其中：绩效支出	0	0	
(三) 结余资金	0.59	0.59	结余资金用于项目结题验收及应付未付费用
合计：	15	15	

6. 项目获奖情况

单位：项

	特等奖	一等奖	二等奖	三等奖
国家自然科学奖	0	0	0	0
国家技术发明奖	0	0	0	0
国家科技进步奖	0	0	0	0
国家部门科技进步奖	0	0	0	0
省科学技术奖	0	0	0	0

注：填写建设期间的累计获奖数。

7. 主要技术指标完成情况

技术指标名称	单 位	合同技术指标	技术指标实际完成情况
高效可食用鹅肝蛋白提取工艺	南京农业大学	无	已建立
阐明鹅肝蛋白加工特性形成机制	南京农业大学	无	已阐明
开发鹅肝新产品	南京农业大学	1-2 种	完成涂抹型和切片型 2 种新产品开发

8. 主要经济指标完成情况

经济指标名称	单 位	合同经济指标	经济指标实际完成情况
新增销售收入	万元		
新增利润	万元	60	109

新增税收	万元	12	37
新增出口创汇	万美元		

9. 主要建设任务指标完成情况

建设任务名称	单 位	合同建设任务	建设任务实际完成情况
--------	-----	--------	------------

注：主要建设任务完成情况由省成果转化专项资金和省创新能力建设计划根据合同规定的实际情况填写。省成果转化专项资金产业化建设任务主要包括厂区、厂房、生产线、大型生产装置、研发设施及项目完成时达到的产能等内容；省创新能力建设计划建设任务包括基础设施、实验室、工程中心、科技服务功能平台，研发服务人才团队及其运行管理制度规范等，其他计划可不填写。



二、主要研究内容及研究成果

1、主要研究内容
<p>要解决主要技术难题和问题：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1、解决鹅肝脏蛋白的安全高效提取问题。 2、解决鹅肝脏蛋白乳化对鹅肝脏产品质量影响控制问题。 3、解决鹅肝脏蛋白凝胶形成对鹅肝脏产品质量影响问题。 4、解决鹅肝脏产品类型单一，缺乏健康化风味型产品的问题。 <p>项目研究的创新点和内容：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1、首次研究并建立高效可食用的鹅肝脏蛋白提取方法和工艺； 2、首次系统的从影响肝脏产品品质最重要的两个主要因素—乳化和凝胶入手研究，揭示其对产品质量的影响机制； 3、首次应用全蛋白质组学和分子动力学研究鹅肝蛋白的加工特性，填补国内空白。 4、建立依据肝蛋白加工特性的肝脏深加工产品质量控制技术；
<p>2、获得研究成果情况： 专利、国外专利（专利名称、专利号、申请或授权时间、主要完成人等）；软件著作权（著作权名称、著作权号、申请或授权时间、主要完成人等）；新（农、兽）药证书、药物临床批件、医疗器械注册证、动植物新品种；集成电路布图设计专有权（授权名称、编号、申请授或授权时间、主要完成人等）；论文等（论文名称、主要完成人、发表刊物名称、发表时间、影响因子等）；科技专著（专著名称、出版单位、时间、主要完成人等）；技术标准（标准名称、编号、发布部门、发布时间、主要完成人等）；新产品、新工艺、新装置等（名称、认定部门、认定时间、主要完成人等）；</p>
<p>（1）授权的专利</p> <p>国家发明专利“富含不饱和脂肪酸的涂抹型禽肝酱及其制作方法(ZL 201410179631.4)”</p> <p>国家发明专利“一种可食用禽肝脏蛋白的提取方法(ZL 201410179630.x)”</p> <p>国家发明专利“低温涂抹型禽肝酱及其生产方法(ZL 201410179632.9)”</p> <p>（2）发表的论文（均已标注项目资助）</p> <p>Guoyuan Xiong, Minyi Han, Zhuangli Kang, Yingying Zhao, Xinglian Xu*, Yingying Zhu. Evaluation of protein structural changes and water mobility in chicken liver paste batters prepared with plant oil substituting pork back-fat combined with pre-emulsification. Food Chemistry, 2016, 196: 388-395.</p> <p>Guoyuan Xiong, Peng Wang, Haibo Zheng, Xinglian Xu*, Yingying Zhu, Guanghong Zhou. Effects of plant oils combinations substituting pork back-fat combined with pre-emulsification</p>

on physicochemical, texture, microstructure and sensory properties of spreadable chicken liver pâté. *Journal of Food Quality*, 2016, 4(39):331-341.

Xiong Guoyuan, Gao Xueqin, Wang Peng, Xu Xinglian*, Zhou Guanghong. Comparative study of extraction efficiency and composition of protein recovered from chicken liver by acid-alkaline treatment. *Process Biochemistry*, 2016, 51(10):1629-1635 .

Guoyuan Xiong, Xueqin Gao, Haibo Zheng, Xinglian Xu*, Huijuan Yang, Guanghong Zhou. Comparison on the physico-chemical and nutritional quality of normal and abnormal colored fresh chicken liver. *Animal Science Journal*, 2016, (In press, doi: 10.1111/asj.12719).

(3) 形成的技术

涂抹型鹅肝酱生产技术、切片型鹅肝酱生产技术。-南京农业大学 2016 年认定，主要完成人徐幸莲、熊国远、王鹏、陈唱。



三、目标任务完成情况

1. 主要解决的关键技术与创新点

1) 主要解决的关键技术

(1) 鹅肝脏蛋白的高效可食用提取技术

针对鹅肝脏蛋白具体氨基酸构成不明确，且缺乏安全有效的从其中提取蛋白技术的现状。本项目首先对鹅肝的蛋白质含量和其氨基酸组成进行了测定，发现鹅肝含有高达 21.17% 的蛋白质，必需氨基酸所占百分比与非必需氨基酸的比例均衡。进一步建立了 pH-鹅肝蛋白溶解度曲线，选取了 pH12.0 溶解-pH5.5 回收这一鹅肝蛋白高效安全的提取工艺，蛋白提取率高达 79%。

(2) 鹅肝脏蛋白乳化特性调控技术

针对鹅肝蛋白的乳化性质研究匮乏，以及 ISP（等电点溶解/沉淀）处理对蛋白质溶解度产生一定不利影响的问题。本项目对肝脏蛋白的乳化活性、乳化稳定性进行了研究，揭示了蛋白浓度、植物油比例对鹅肝蛋白乳化性质的影响规律。进一步运用磷酸化处理，显著提升了高 pH 溶解-等电点回收鹅肝蛋白的溶解度及乳化性。

(3) 基于鹅肝蛋白的凝胶特性调控技术

研究了蛋白浓度、pH、NaCl、加热温度这 4 个加工因素对鹅肝蛋白的凝胶性能的影响规律；进一步进行基于质谱分析的分子模拟，发现 pH 对典型鹅肝蛋白的二级结构以及表面电荷有显著影响。建立了鹅肝蛋白的热诱导凝胶相图，为生产优质凝胶型鹅肝脏深加工产品提供基础。

(4) 鹅肝脏深加工新产品的开发

在前述对肝脏蛋白的乳化及凝胶规律研究的基础上，结合市场对于蛋白补充型产品的实际需求，优化建立了涂抹型和切片型两种鹅肝脏深加工产品加工工艺。

2) 本项目的创新点

(1) 创新性地使用蛋白组学为工具，研究了泛磷酸化对蛋白质的修饰作用及乳化性能提升机理。首次应用 Label-free LC MS/MS 蛋白组学方法研究了 ISP 鹅肝蛋白参加乳化的蛋白类型和差异蛋白的情况，发现了泛磷酸化作用后参与乳化的 ISP 肝蛋白类型与对照蛋白的差异。

(2) 创新性地将 ISP（等电点溶解/沉淀法）应用到鹅肝蛋白的提取。建立了一套适合鹅肝蛋白高效安全的提取方法和工艺，并对提取的肝脏蛋白的功能特性进行分析，在为后续深入研究奠定基础的同时，达到了从不适合加工成优质肝脏产品的鹅肝脏中提出可食用蛋白并在食品工业中加以应用的目的。

(3) 创新性地研发了鹅肝产品。突破传统上以酱卤为主的鹅肝深加工产品现状。在

分析鸡肝理化和营养特性以及工艺优化的基础上，研发了富含不饱和脂肪酸的鹅肝酱新产品。

2. 主要技术与经济指标完成情况

1) 主要技术指标完成情况

项目的合同的技术指标为：建立高效可食用鹅肝蛋白提取工艺；阐明鹅肝蛋白加工特性形成机制；开发鹅肝新产品 1-2 种。

本项目实施后，技术指标的实际完成情况为：首次建立了基于 ISP 的鹅肝蛋白提取的技术，提取率达 79%，为从鸡肝中回收可食用蛋白提供了高效、安全的方案；综合运用流变学、光谱学和分子模拟等分析方法，揭示了鸡肝蛋白的凝胶和乳化形成机制，进一步运用定量蛋白组学技术阐明了磷酸化处理提高鸡肝蛋白乳化能力的机理；优化了鹅肝产品的加工工艺参数，开发了涂抹型和切片型两个鹅肝新产品。

2) 主要经济指标完成情况：

项目的合同的经济指标为：生产优质鹅肝产品 10000kg，新增经济效益 60 万元，利税 12 万元。

本项目实施后，实际生产优质鹅肝产品 12000 kg，新增经济效益 109 万元，利税 37 万元。

3、项目实施的经济、社会效益

1) 经济效益：

本项目实施后，直接经济效益为生产优质鹅肝产品 12000 kg，新增经济效益 109 万元，利税 37 万元。间接上，通过涂抹型和切片型鹅肝的新产品溢价效应，为相应企业提升了产品的市场竞争力及远期盈利能力。

2) 社会效益：

a、对三农的意义：为鹅肝这一典型的农产品加工副产物提供了新的深加工技术方案，为饲养户提供了新的增收途径，对“三农”有重要意义。

b、对食品产业的带动效应：突破了我国对鹅肝的利用以酱卤产品为主的现状，研发了营养健康的低温涂抹型鹅肝酱和富含不饱和脂肪酸的涂抹型鹅肝酱产品。为食品加工工业的产品创新提供了新的产品形式，为以鹅肝为蛋白来源的食品打开了思路。

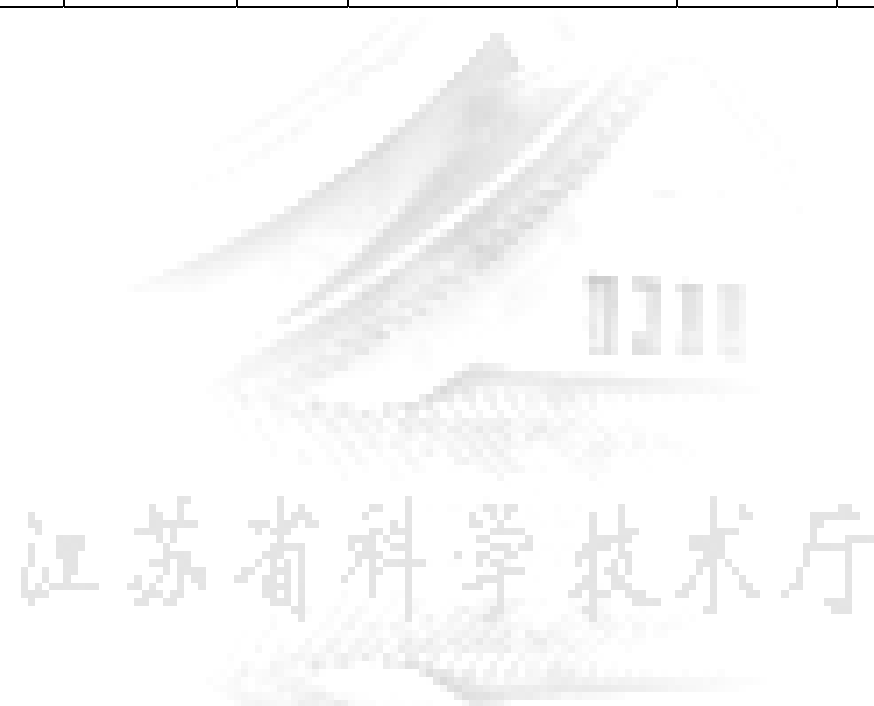
c、人才培养：通过项目实施，培养研究生 3 人，其中博士 1 人，为畜禽副产物利用领域输送了专业人才。

4、项目能力建设任务完成情况（省创新能力建设计划填写）

四、项目主要参加人员名单

姓名	性别	出生年份	职称	学位	从事专业	本项目 工作时间(%)	工作单位	项目 分工	国别	身份证件号码	签名
项目骨干（不超过 5 人，不含项目负责人）											
徐幸莲	女	1962-05-21	正高	博士	食品科学	80	南京农业大学	主持	中国	320113196205214862	
吉鉴宏	男	1957-09-09	副高	学士	管理学	60	扬州天歌鹅业发展有限公司	副主持	中国	321002195709090631	
王鹏	男	1979-03-04	副高	博士	食品科学	60	南京农业大学	技术主持	中国	150404197903041412	
熊国远	男	1975-01-30	副高	博士	食品科学	60	南京农业大学	产品研发	中国	340103197501306011	
韩敏义	男	1975-09-12	副高	博士	食品科学	30	南京农业大学	凝胶机制	中国	132324197509120516	
参加人员（不超过 10 人）											
李春保	男	1978-10-10	正高	博士	食品科学	20	南京农业大学	蛋白组学	中国	342326197810100652	
邓绍林	男	1986-10-09	中级	硕士	食品科学	30	南京农业大学	产品研发	中国	430281198610092332	
白云	女	1984-02-22	中级	硕士	食品科学	40	南京农业大学	乳化机制	中国	612321198402228623	
张勇	男	1972-04-18	中级	学士	经济学	40	扬州天歌鹅业发展有限公司	产品研发	中国	321002197204181510	
包庆	女	1965-05-06	中级	学士	食品科学	40	扬州天歌鹅业发展有限公司	产品研发	中国	110108196505065432	

朱春兰	女	1966-03-14	中级	学士	食品科学	40	扬州天歌鹅业发展有限公司	品质控制	中国	321002196603140623	
张玉龙	男	1990-03-31	-	硕士	食品科学	80	南京农业大学	蛋白组学	中国	340321199003314054	
李鑫	女	1993-08-18	-	学士	食品科学	80	南京农业大学	蛋白提取	中国	152301199308186541	
陈唱	女	1993-02-13	-	学士	食品科学	80	南京农业大学	产品研发	中国	34222219930213606X	



项 目 主 要 依 托 单 位
1. 扬州天歌鹅业发展有限公司
验 收 文 件 和 资 料 目 录
1. 项目合同书 2. 项目立项批文 3. 工作总结报告 4. 技术总结报告 5. 绩效分析报告 6. 经费决算表 7. 合作企业出具的项目完成情况与应用情况报告 8. 相关佐证材料（专利、论文）

江苏省科学技术厅

项目主管部门意见	
<div>单位负责人签字: (单位盖章)</div> <div>年 月 日</div>	
省科技厅专项计划主管处室意见	
<div>处负责人签字: (部门盖章)</div> <div>年 月 日</div>	
省科技厅发展计划与财务处意见	
<div>处负责人签字: (部门盖章)</div> <div>年 月 日</div>	

前瞻性联合研究项目

基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白

加工特性研究

工 作 总 结 报 告

一、任务来源

江苏省前瞻性联合研究项目“基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究（BY2014128-02）”。

二、选题背景

（一）选题依据

随着我国养殖业的规模化、标准化程度的提升，肉鹅的饲养与加工量一直呈上升趋势。而作为肉鹅产业重要副产物的鹅肝，其深加工利用程度及产品的种类丰富性却没有跟上消费者的需要。鹅肝的深加工相对落后主要体现在：深加工产品形式多为传统的酱卤和腌制品、鹅肝产品的口感和风味不佳、缺乏针对不同人群营养需要的蛋白补充型鹅肝产品。鹅肝的加工价值没有得到很好的体现的原因，主要是食品界对鹅肝的加工性能，尤其是对含量高达近20%的肝脏蛋白的加工特性了解甚少，缺乏相应的应用基础型、前瞻性研究。

（二）研究目的与意义

本项目主要针对鹅肝深加工产品的生产加工中，鹅肝蛋白的功能调控对产品品质形成机制影响的重大关键技术问题开展相关研究。重点关注肝脏蛋白的高效安全提取方法和工艺、肝脏蛋白在加工过程中的保油保水机理、乳化性、凝胶特性等，创新性的结合蛋白组学和分子动力学模拟，阐明肝蛋白对肝脏产品品质形成的影响机制，从而提升鹅肝脏产品的品质，生产出优质的肝脏深加工新产品和完全可食用的鹅肝脏蛋白，增加企业效益，促进产业技术水平的提升，推动产业技术升级。本项目所涉及的肝蛋白对产品品质形成影响机制在国内外尚属于畜禽副产物的新兴研究领域，蛋白质组学和分子动力学模拟等也属于新兴研究方法。因此，本项目的实施，将有助于拓展国内畜禽副产物利用研究的领域，带动学科的发展。

（三）研究任务

研究鹅肝脏蛋白的安全高效提取方法。鹅肝脏蛋白的乳化和热诱导凝胶性质影响因素及其调控。利用蛋白组学和分子动力学模拟技术，研究鹅肝脏蛋白乳化及热诱导凝胶的形成机理。研究原料互做对鹅肝脏深加工产品品质的影响，在此基础上优化新型鹅肝产品的配方。

三、研究工作的组织过程

(一)、项目组织过程

1、根据本课题的实际情况，采用了二级管理体制，即课题领导小组和课题科研小组。课题领导小组主要负责课题的组织和协调，包括技术方案的论证、科研基地的落实、科研经费的落实和分配、任务的分工、人员的调配等方面；课题科研小组对课题领导小组负责，主要开展具体的科研工作，包括科研计划的制定、实施、产业化过程中的技术问题、科研经费的使用、项目的总结等。

2、课题由科研单位牵头并作为技术支撑，企业开展技术示范并反馈实际应用效果，实行目标管理。

3、明确课题的任务、分工和责任人，杜绝课题衔接的灰色区域，做到既分工又合作；保证经费的有效合理使用，做到专款专用。

4、实行定期召开研究会议制度，及时进行研究汇报并调整、解决研究工作中出现的问题，严格按任务计划进行组织实施，使研究课题有条不紊地进行。

(二)、主要参加人员

姓 名	性 别	技术职称	学位	单 位	承担的主要任务
徐幸莲	女	正高	博士	南京农业大学	主持
吉鉴宏	男	副高	学士	扬州天歌鹅业发展有限公司	副主持
熊国远	男	副高	博士	南京农业大学	技术主持
王 鹏	男	中级	博士	南京农业大学	蛋白提取工艺
李春保	男	副高	博士	南京农业大学	蛋白组学
邓邵林	男	初级	硕士	南京农业大学	产品研发
韩敏义	男	副高	博士	南京农业大学	凝胶机制
白 云	女	中级	硕士	南京农业大学	乳化机制
张 勇	男	中级	学士	扬州天歌鹅业发展有限公司	产品研发
包 庆	女	中级	学士	扬州天歌鹅业发展有限公司	产品研发
朱春兰	女	中级	学士	扬州天歌鹅业发展有限公司	品质分析
张玉龙	男	-	硕士	南京农业大学	蛋白组学
李鑫	女	-	学士	南京农业大学	蛋白提取
陈唱	女	-	学士	南京农业大学	产品研发

四、主要成果的创新性、先进性及应用情况

（一）主要研究成果

检测了原料鹅肝的主要营养成分及蛋白质氨基酸构成，弥补了此方面基础数据的不足。首次建立了基于 ISP（等电点溶解/沉淀）的鹅肝蛋白提取的技术，提取率达 79%，为从鸡肝中回收可食用蛋白提供了高效、安全的方案；综合运用流变学、光谱学和分子模拟等分析方法，揭示了鸡肝蛋白的凝胶和乳化形成机制，进一步运用定量蛋白组学技术阐明了磷酸化处理提高鸡肝蛋白乳化能力的分子机理；优化了鹅肝产品的加工工艺参数，开发了涂抹型和切片型两个鹅肝新产品。

（二）主要研究成果的创新性和先进性

1、研究成果的创新性：

创新性地对复杂蛋白体系的磷酸化进行了蛋白组学为工具的研究，揭示泛磷酸化对蛋白质的修饰作用及乳化性能提升机理，为食品科学领域的蛋白质磷酸化研究提供高价值的借鉴资料。。

创新性地~~将~~ISP（等电点溶解/沉淀法）应用到鹅肝蛋白的提取。建立了一套适合鹅肝蛋白的高效安全的提取方法和工艺，并对提取的肝脏蛋白的功能特性进行分析。

2、研究成果的先进性：

目前健康型的食品是国际研发的主流，但以系统性地以鹅肝脏为原料的应用基础研究及相应的产品研发在国内却十分匮乏。本研究形成了涂抹型和切片型两种鹅肝新产品，突破了以往我国对鹅肝的利用主要以冷冻原料或酱卤熟食销售的产品形式，且产品的营养构成符合婴幼儿及成人的健康需求，引领了我国肝脏副产物产品研发的新趋势。

（三）文章、专利、人才培养情况

本项目执行期间，在国内外期刊发表论文 4 篇，其中 SCI 收录 4 篇。授权发明专利 3 项，培养研究生 3 名

五、推广应用前景

中国作为鹅生产的传统大国，而江苏又有全国知名的扬州鹅品种，生产原料鹅肝的产量大，品质优，但对鹅肝的深加工则相对落后，产品形式单一（鹅肝深加工产品多为酱卤和腌制品）。加工技术落后，相关加工机理研究不清，是造成鹅肝价值没有得到很好的体现的重要原因。但随着科技的进步和人民生活水平的提高，消费者对加工食品的要求也越来越高，已不满足于吃饱，而是要求产品形

式的新颖化，产品配方的营养化。因此，营养丰富而均衡、易消化、色香味俱佳的新型鹅肝制品的研究开发顺应了食品行业趋势和消费者的需求。本技术可利用凝胶乳化肉制品企业原有的生产线，生产出分别针对于婴幼儿和成人的涂抹型和切片型鹅肝酱产品，进一步推广潜力巨大。

前瞻性联合研究项目

基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白

加工特性研究

技术总结报告

目 录

引 言	41
1 鹅肝脏蛋白的基本成分测定及蛋白提取方法的建立	42
1.1 鹅肝主要成分的测定	42
1.1.1 主要成分的测定方法	42
1.1.2 主要成分的测定结果	42
1.2 鹅肝蛋白提取方法的建立	44
1.2.1 研究方法	44
1.2.2 pH-鹅肝蛋白溶解度曲线及提取方法建立	44
2 基于组学的鹅肝脏蛋白乳化特性研究	47
2.1 鹅肝蛋白质的提取与实验设计	47
2.2 鹅肝蛋白乳化相关功能性质测定方法	47
2.2.1 蛋白质溶解度	47
2.2.2 蛋白质粒径	48
2.2.3 蛋白质乳化特性	48
2.2.4 乳化层蛋白分离提取	48
2.2.5 乳化层蛋白质质谱鉴定及组学分析	48
2.3 鹅肝蛋白乳化相关功能性质测定结果	50
2.3.1 蛋白质溶解度	50
2.3.2 蛋白质粒径	51
2.3.3 蛋白质乳化特性	52
2.3.4 参与乳化蛋白质的质谱鉴定及组学分析	55
3 基于组学和分子模拟的鹅肝蛋白的凝胶特性研究	63
3.1 研究方法	63
3.1.1 相图研究	63
3.1.2 光谱学研究	63
3.1.3 蛋白质质谱研究	64
3.1.3 分子模拟研究	64
3.2 鹅肝蛋白凝胶相图研究结果	65
3.3 鹅肝蛋白质光谱学研究结果	67
3.4 鹅肝蛋白质分子模拟结果	68
3.4.1 等电点沉淀回收鹅肝蛋白质质谱鉴定结果	68

3.4.2 等电点沉淀回收鹅肝蛋白质表面电荷势能和疏水区域模拟结果	71
4 鹅肝脏深加工新产品的开发	77
4.1 涂抹型鹅肝酱的研制	77
4.1.1 工艺流程	77
4.1.2 操作要点	77
4.1.3 实验设计	77
4.1.4 检测方法	78
4.1.5 涂抹型肝酱实验结果分析	79
4.2 切片型鹅肝产品的研制	90
4.2.1 工艺流程	90
4.2.2 操作要点	91
4.2.3 实验设计	91
4.2.4 检测方法	92
4.2.5 切片型肝酱实验结果分析	93
结 论	107
参 考 文 献	109
附 录	111

插图清单

图 1-1 pH 对鹅肝蛋白溶解度的影响.....	45
图 1-2 不同 pH 回收的鹅肝蛋白提取率.....	46
图 2-1 蛋白质溶解度	51
图 2-2 蛋白质浓度对乳化活性的影响.....	52
图 2-3 蛋白质浓度对乳化稳定性的影响.....	53
图 2-4 蛋白液与大豆油比例对乳化活性的影响.....	53
图 2-5 蛋白液与大豆油比例对乳化稳定性的影响.....	54
图 2-6 鹅肝蛋白质乳化活性	54
图 2-7 鹅肝蛋白质乳化稳定性	55
图 2-8 蛋白质鉴定质谱信号总图	56
图 2-9 各组组间三次重复实验鉴定到的蛋白质重叠分析.....	57
图 2-10 AP50 样品中含量最高的前 20 种蛋白在其他样品中的含量比值分布	59
图 2-11 AP 样品中含量最高的前 20 种蛋白在其他乳化层蛋白质组中的含量比值分布.....	59
图 2-12 差异蛋白质模式图	61
图 2-13 组乳化组样品中磷酸-蛋白质在原鹅肝蛋白样品中的含量比值分布.....	62
图 3-1 蛋白浓度 (mg/g) 与 pH 相图	65
图 3-2 蛋白浓度 (mg/g) 与 NaCl (mM) 浓度相图	65
图 3-3 蛋白浓度 (mg/mL) 与温度 (°C) 相图.....	66
图 3-4 NaCl 浓度 (mM) 与 pH 相图	66
图 3-5 pH 对 50°C 加热蛋白的紫外荧光吸收性质的影响.....	67
图 3-6 温度和 pH 对鹅肝蛋白二级结构含量的影响.....	68
图 3-7 Myosin-7 (肌球蛋白 7) 的表面电荷势能模拟结果	71
图 3-8 Hemoglobin subunit alpha-A (血红蛋白亚基) 的表面电荷势能及疏水区域模拟结果.....	72
图 3-9 Histone H3.2 (组蛋白 H3.2) 的表面电荷势能及疏水区域模拟结果.....	73
图 3-10 三种蛋白的二级结构比例理论计算结果.....	73
图 3-11 三种蛋白的二级结构立体模拟结果.....	74
图 4-1 涂抹型鹅肝酱的生产工艺流程.....	77
图 4-2 不同淀粉添加量下, 剪切速率对剪切应力和粘度的影响.....	80
图 4-3 不同淀粉添加量下, 加热温度对流变模量的影响.....	81
图 4-4 不同油脂添加量下, 剪切速率对剪切应力和粘度的影响.....	83

图 4-5 不同油脂添加量下，加热温度对流变模量的影响.....	84
图 4-6 不同冰水添加量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响.....	86
图 4-7 不同冰水添加量下，加热温度对流变模量的影响.....	87
图 4-8 涂抹型鹅肝酱产品主要营养成分.....	90
图 4-9 切片型鹅肝酱产品的生产工艺流程.....	91
图 4-10 不同淀粉添加量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响.....	94
图 4-11 不同淀粉添加量下，加热温度对流变模量的影响.....	95
图 4-12 不同油脂添加量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响.....	97
图 4-13 不同油脂添加量下，加热温度对流变模量的影响.....	98
图 4-14 不同鹅肝用量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响.....	100
图 4-15 不同鹅肝用量下，加热温度对流变模量的影响.....	101
图 4-16 切片型鹅肝酱产品主要营养成分.....	104

附表清单

表 1-1 原料鹅肝的主要成分	42
表 1-2 原料鹅肝的氨基酸含量	43
表 2-1 质谱参数	50
表 2-2 Nano LC 液相梯度.....	50
表 2-3 蛋白质粒径	51
表 2-4 蛋白质鉴定数目汇总表	57
表 2-5 每组处理中信号强度最高的前 20 种蛋白质排名.....	58
表 2-6 每组处理中信号强度最高的前 20 种蛋白质的理论等电点.....	60
表 2-7 蛋白质的长度、理论等电点及磷酸位点.....	62
表 3-1 不同温度和 pH 对鹅肝蛋白紫外荧光吸收的影响.....	67
表 3-2 鹅肝蛋白质谱分析结果前 20 种蛋白.....	69
表 4-1 鹅肝酱感官评定表	79
表 4-2 不同玉米淀粉添加量下肝酱的质构测定结果.....	82
表 4-3 不同玉米淀粉添加量下肝酱的感官评定结果.....	82
表 4-4 不同橄榄油添加量下肝酱的质构分析.....	85
表 4-5 不同橄榄油添加量肝酱的感官评定结果.....	85
表 4-6 不同冰水添加量的质构分析	87
表 4-7 不同冰水添加量的感官评定结果.....	88
表 4-8 切片型产品正交实验表	88
表 4-9 切片型产品感官评定正交实验表.....	89
表 4-10 切片型产品最优配方对照表	89
表 4-11 鹅肝切片型产品感官评价表.....	93
表 4-12 玉米淀粉添加量的质构分析	95
表 4-13 玉米淀粉添加量的感官评定分析结果.....	96
表 4-14 不同橄榄油添加量的质构分析结果.....	98
表 4-15 不同橄榄油添加量的感官评定结果.....	99
表 4-16 不同鹅肝添加量的质构分析结果.....	102
表 4-17 不同鹅肝添加量的感官评定结果.....	102
表 4-18 切片型产品正交实验表	103
表 4-19 切片型产品感官评定正交实验表.....	103
表 4-20 切片型鹅肝酱产品最优配方	104
表 4-21 切片型鹅肝酱产品颜色及保水性指标.....	105

引 言

鹅肝因其风味独特，营养丰富，且含有大量人体不可缺少的不饱和脂肪酸和多种维生素，使其成为补血养生的最佳食物之一。欧洲人将鹅肝与鱼子酱、松露并列为“世界三大珍馐”，肝脏蛋白又被称为“完全营养蛋白”。法国、匈牙利、以色列、德国、比利时等欧洲国家将鹅肝作为传统高档消费食品，造就了这些国家年总消费量达1.2万吨的市场规模，且随着日本、美国、韩国、澳大利亚、加拿大等国家快速形成对鹅肝的消费习惯，全球市场需求量在不断攀升，有望进一步形成年消费量达到10万吨的市场。在中国，随着人民生活水平的提高，鹅肝的价值已被人们所认识和接受，其市场潜力非常巨大，但尚缺乏相应的科技支撑。

中国作为鹅生产的传统大国，而江苏又有全国知名的扬州鹅品种，生产鹅肝产量大，品质优，但鹅肝的深加工则相对落后，产品形式单一（鹅肝深加工产品多为酱卤和腌制品），保水保油能力差，口感风味不佳，鹅肝的加工价值没有得到很好的体现。究其原因，主要是对鹅肝加工性能，尤其是对含量高达近20%的肝脏蛋白的加工特性了解甚少。蛋白质在畜禽产品的加工过程中起着非常关键的作用，国内外的研究表明，蛋白质的保油保水性、乳化能力和凝胶形成能力，决定着对食品的质构以及消费者接受程度。而到目前为止，国内研究鹅肝产品生产工艺的文章为数不多，且一般限于中式烹饪技术的应用。也有国内研究者对鹅肝的主要营养成分进行了分析，但对肝脏蛋白进行提取的研究却很少，对鹅肝肝脏蛋白加工特性尚无研究。国外尤其欧美国家是生产鹅肝酱等西式鹅肝产品的重要技术来源，对鹅肝酱加工技术研究甚多，但亦缺乏对影响肝脏重要加工特性的肝脏蛋白及其在加工过程中对产品品质形成机制的研究。

国内外对蛋白的研究手段和方法已很成熟，蛋白质组学、分子动力学、透射电镜、质谱法、电泳技术等得到广泛应用。蛋白质组学能大规模地对蛋白质进行综合分析，对蛋白功能做出精细和准确的阐述，是研究蛋白质的一种重要手段。分子动力学则可以对有关蛋白在不同条件下模拟蛋白三维构象的变化，能从微观角度研究蛋白质的分子机理。因此有必要结合这些先进的研究手段和方法，对影响鹅肝产品品质的鹅肝蛋白的加工特性及其对产品品质形成机理进行研究，为产业发展提供重要技术支撑。本项目重点关注肝脏蛋白的高效安全提取方法和工艺、肝脏蛋白在加工过程中的保油保水机理、乳化性、凝胶特性，创新性的结合蛋白质组学和分子动力学阐明肝蛋白对肝脏产品品质形成的影响机制，从而为鹅肝产品的品质调控提供理论基础和技术指导。

1 鹅肝脏蛋白的基本成分测定及蛋白提取方法的建立

1.1 鹅肝主要成分的测定

1.1.1 主要成分的测定方法

水分含量的测定：取预先干燥至恒重的称量皿，准确称取 m_0 （约 2.00 g）鹅肝，放置于 105℃烘箱中，干燥 24 h 至恒重。记录干燥恒重前后称量皿和鹅肝的总质量分别为 m_1 和 m_2 ，水分含量按以下公式计算：

$$W = (m_1 - m_2) / m_0 * 100\%$$

蛋白质含量测定：采用凯氏定氮法（GB 5009.5-2010《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》）。

脂肪的测定：采用索氏抽提法（GB/T 5009.6-2003 食品中脂肪的测定）。将抽提的脂肪收集后，于-20℃储存备用；

灰分测定：采用灼烧法（GB 5009.4 - 2010《食品安全国家标准食品中灰分的测定》）。

氨基酸的测定：将鹅肝样品切碎，剔除可见脂肪与结缔组织，切成肉糜状，准确称取 0.5 g 样品（精确到 0.0001 g），放入研钵中，加入 5.0 mL 10 % 的磺基水杨酸溶液，研磨均匀后，用 2.0 M 的氢氧化钠将溶液 pH 调成 2.0，移入 50 mL 容量瓶中，用蒸馏水定容；取 3.0 mL 离心（12000 rpm/min，10 °C，20 min）后，取上清液 2.0 mL 加入 1.0 mL 石油醚，混匀后静置 1h，弃去石油醚，取下层溶液 1.0mL，通过 0.2 μm 水相滤头，注入进样瓶中，用氨基酸自动分析仪检测各种氨基酸含量。

1.1.2 主要成分的测定结果

表 1-1 原料鹅肝的主要成分

成分名称	含量（%）
蛋白质	21.17±0.7
脂肪	2.21±0.16
水分	70.40±2.79
灰分	2.14±0.09

注：结果用平均值（n=5）±标准差表示。

由表 1-1 的测定结果可见，原料鹅肝中的主要成份是占 70.40%的水，，其次是占 21.17%的蛋白质。由此看出鹅肝中含有丰富的动物蛋白，具有作为人体所需蛋白质补充来源的应用潜力。

表 1- 2 原料鹅肝的氨基酸含量

氨基酸种类		含量 mg/100g	FAO/WHO/UNU 推荐值成人（婴儿）
必需氨基酸			
苏氨酸	Thr	13.278±0.532	2.3 (2.5)
蛋氨酸	Ala	19.502±0.48	2.2 (2.4)
缬氨酸	Val	11.758±0.371	3.9 (4.0)
异亮氨酸	Ile	11.178±0.405	3.0 (3.1)
亮氨酸	Leu	27.491±1.146	5.9 (6.1)
苯丙氨酸	Phe	28.958±3.312	3.8 (4.1)
赖氨酸	Lys	15.896±0.701	4.5 (4.8)
组氨酸	His	6.702±0.400	1.5 (1.6)
色氨酸	Trp	ND	0.6 (0.7)
总的必需氨基酸		134.763	
非必需氨基酸			
精氨酸	Arg	19.038±2.227	
酪氨酸	Tyr	10.482±0.643	
甲硫氨酸	Met	10.408±0.274	
半胱氨酸	Cys	3.748±0.312	
丝氨酸	Ser	11.824±0.384	
谷氨酸	Glu	31.377±0.681	
甘氨酸	Gly	11.510±0.184	
天冬氨酸	Asp	13.159±0.350	
总的非必需氨基酸		111.547	

鹅肝中共检测出了 17 种氨基酸，其中谷氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、丙氨酸是四种主要的氨基酸，谷氨酸的含量最高为 31.377%，半胱氨酸的含量最低。鹅肝中的天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸和丙氨酸这四种鲜味氨基酸总含量为 75.55 %，因为在盐酸水解条件下人体必需氨基酸色氨酸非常容易被破坏，所以用仪器很难检测到。其他人体必需氨基酸均检测到，其中组氨酸在婴儿体内不能合成，需要

外源摄入，鹅肝中含量远高于 FAO/WHO/UNU 推荐的成人（婴儿）食物蛋白中的组氨酸含量为 1.5%（1.6%）的标准。鹅肝中的必需氨基酸所占百分比几乎与非必需氨基酸的比例均衡，其中赖氨酸含量很高，为可见肝脏的营养价值是相对较高的。

1.2 鹅肝蛋白提取方法的建立

鹅肝作为鹅的主要副产物之一，由于其口感质地粗糙，腥味较重，难于被广大消费者接受。在国内，约 50%的鹅肝作为动物饲料利用。如果将普通鹅肝转化成人消费食品，将大大提高其经济价值。蛋白质，作为人类重要的营养素之一，在鹅肝中含量高达 20%左右。为了提升鹅肝的利用价值，我们试图探索一种高效快速的蛋白质提取方法，将鹅肝蛋白提取出来加以利用，如作为肉蛋白替代品，或食品添加剂等使用。

1.2.1 研究方法

取 50g 鹅肝样品，加入 6 倍体积预冷的去离子水（0~4℃）， 10^5 rpm 匀浆 3 次，每次 20s，共计 1min。采用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 或 NaOH 逐滴加入匀浆液，调节溶液 pH 至指定数值，静置 10min，使蛋白质充分溶解，在此期间微调溶液 pH，使其读数保持不变。然后匀浆液在 4℃ $10000\times g$ 条件下，离心 10min。此时溶液分为三层，上层为密度小的脂肪层，中间层为蛋白质溶液，下层则为不溶性蛋白及其它杂质。取中间蛋白溶解层，用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 或 NaOH 溶液逐滴加入，调节 pH 至 5.5，静置 10min，使蛋白质充分沉淀，在 4℃条件下 $10000\times g$ ，离心 10min，得到蛋白沉淀。为防止蛋白质受温度影响而发生变性，以上鹅肝蛋白提取过程均在 0~4℃下进行。

1.2.2 pH-鹅肝蛋白溶解度曲线及提取方法建立

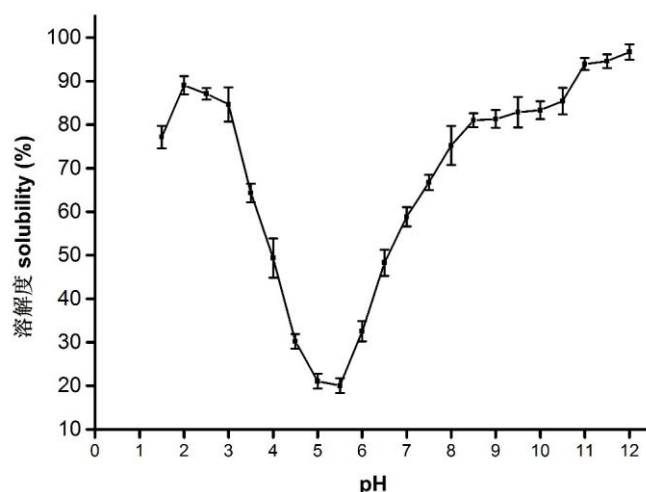


图 1-1 pH 对鹅肝蛋白溶解度的影响

由图 1-1 可见，鹅肝蛋白溶解度曲线呈现“U”字型，鹅肝蛋白在 pH5.5 的溶解度最低；根据文献数据，5.5 亦接近大多数鹅肝蛋白等电点。在等电点时，蛋白质所带静电荷为 0，因而蛋白质分子间相互聚集，沉淀出来。当 pH 由 pI 向两侧增大或减小时，蛋白质的溶解度增大。这是因为蛋白质分子所带净电荷增加，蛋白质-水分子的静电作用逐渐取代了蛋白质-蛋白质分子间的相互作用，从而蛋白质分子膨胀、伸展开来，溶于水中。酸碱处理提取鹅肝蛋白被广泛应用于鱼肉，鸡肉，及动物副产物中，也同样适用与鹅肝蛋白的提取。

能够以高提取率回收鹅肝蛋白，对于提高低值鹅肝的经济价值至关重要。蛋白质的提取率主要取决于如下三个因素：1) 在极端酸/碱性条件下蛋白质的溶解度大小；2) 在等电点时蛋白质的溶解度大小；3) 第一次离心所得沉淀物颗粒大小。一般来说，前两个因素是决定蛋白质提取率的关键因素。基于上述研究，选取 pH2.0、pH2.5、pH3.0、pH11.0、pH11.5、pH12.0 将鹅肝蛋白溶解，之后在 pH5.5 处将蛋白质沉淀回收，共计 6 个试验组，进行后续研究。结果如图 1-2 所示，在 pH12.0 时蛋白质的提取率最高，达到 79.00%，在 pH3.0 时蛋白质的提取率最低，只有 58.39%。在 pH2.0、pH11.0 和 pH11.5 各组中蛋白质的提取率没有显著差异 ($P>0.05$)。随着提取 pH 条件酸性或碱性的增强，蛋白质的提取率是呈现增加趋势，且碱处理组蛋白质的提取率高于酸处理组。在蛋白质溶解度曲线中，随着酸/碱性的增加，蛋白质溶解度增大，且 pH11.0~12.0 条件下的溶解度高于 pH2.0~3.0 条件下的溶解度，这与提取率结果的趋势相吻合。说明对于鹅肝蛋白的提取，在极端酸碱性条件下蛋白质的溶解度对于鹅肝蛋白提取率高低是一个重要的前提因素，根据本研究的发现，可以将原料鹅肝在高 pH (12.0) 下进行溶解，在等电点 5.5 下进行回收，可达到最大的提取效率。

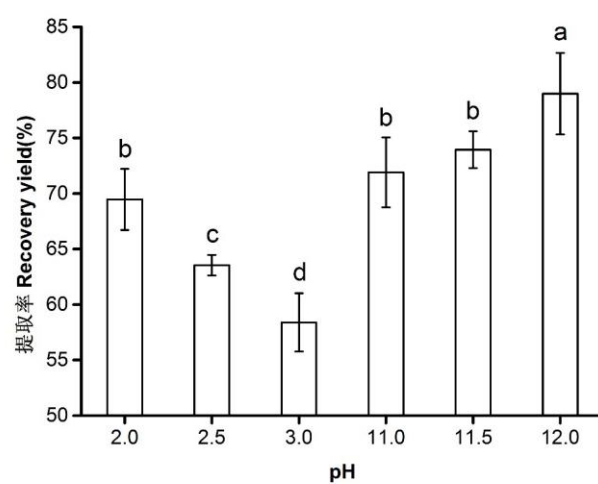


图 1-2 不同 pH 回收的鹅肝蛋白提取率

注：同一处理不同的字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

2 基于组学的鹅肝脏蛋白乳化特性研究

本项目经过前期研究发现，鹅肝蛋白质经酸碱法提取后，由于部分蛋白质发生变性，进而引起蛋白质乳化性质会降低。基于提升酸碱法所提取的鹅肝蛋白质乳化性能的目的，本实验采用非酶广泛磷酸化对鹅肝蛋白质进行磷酸化修饰，研究磷酸化对鹅肝蛋白质乳化性质的影响。

2.1 鹅肝蛋白质的提取与实验设计

按照 1.2.2 建立的鹅肝蛋白提取方法，准确称取 50g 鹅肝糜 5 份，以料液比 1:6 与蒸馏水混合，10000×g 匀浆 20s，共匀浆 3 次。第一份匀浆液经 4 层纱布过滤得滤液，滤液的 pH 被调节至 5.50，于 10000×g、4℃ 离心 10min，沉淀蛋白质，标记为 AP；第二份匀浆液的 pH 被调节至 12.00，于 10000×g、4℃ 离心 10min，除去不溶物质，调节上清液 pH 至 5.50，在相同离心条件下沉淀蛋白质，标记为 OP1；第三份匀浆液的 pH 被调节至 12.00，于 10000×g、4℃ 离心 10min，除去不溶物质，维持上清液 pH12.00，以蛋白含量的 1% 添加三聚磷酸钠，在 40℃ 条件下反应 50min，调节反应液 pH 至 5.50，在相同离心条件下沉淀蛋白质，标记为 OP2；剩余 2 份匀浆液 pH 被调至 12.00，于 10000×g、4℃ 离心 10min，除去不溶物，再调节上清液 pH 至 5.5，在相同离心条件下沉淀蛋白质。沉淀蛋白质分为 2 份，均配制终浓度为 5% 的蛋白质溶液，调节 2 份蛋白质溶液的 pH 至 12.00，其中一份添加三聚磷酸钠（终浓度为蛋白质浓度的 1%），另一份不添加，在 40℃ 反应 50min 后，分别调节蛋白质溶液 pH 至 5.50，于 10000×g、4℃ 离心 10min 沉淀蛋白质，不添加三聚磷酸钠的蛋白质组标记为 RP4，添加三聚磷酸钠的蛋白质组标记为 RP5。

2.2 鹅肝蛋白乳化相关功能性质测定方法

2.2.1 蛋白质溶解度

取 AP、OP1、OP2、RP4 和 RP5 组的蛋白质，均配制成浓度为 10mg/mL 的蛋白质溶液，调节溶液 pH 为 7.00 和 12.00，取上述各组蛋白质溶液，分为 2 组，一组用于测定蛋白质总含量，另一组于 10000×g、4℃ 离心 10min，取上清液并测定蛋白质含量，计算蛋白质的溶解度。

2.2.2 蛋白质粒径

取上述 5 组鹅肝蛋白质，用 20mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.50）和 NaOH 溶液配制 1mg/mL 的蛋白质溶液，前者蛋白质溶液 pH 为 7.00，后者的 pH 为 12.00。采用纳米粒度仪测定溶液中蛋白质的粒径。

2.2.3 蛋白质乳化特性

为研究蛋白质浓度对乳化特性的影响，取 OP1 组蛋白质，调节蛋白质浓度分别为 2.50、5.00、10.00、15.00、20.00、25.00、30.00、35.00mg/mL，pH 调至 12.00，蛋白质溶液与大豆油以 3：7 的比例在 10000r/min 的条件下进行乳化，取 0.1mL 乳化液经 250 倍稀释后于 600nm 测定吸光值。蛋白质乳化活性以对应的乳化活性指数来表示，乳化稳定性以 4d 后乳化层高度（cm）与乳化液总高度（cm）的比值乘以 100 表示。

为研究植物油比例对乳化特性的影响，取 OP1 组蛋白质，调节蛋白质浓度为 35mg/mL，pH 为 12.00。蛋白质溶液与大豆油分别以 1：4、3：7、2：3、1：1、3：2、7：3、4：1 的比例在 10000rpm 的条件下进行乳化，乳化活性及乳化稳定性表示方法同上述方法 3。

为研究磷酸化对鹅肝蛋白质乳化特性的影响，取 AP、OP1、OP2、RP4 和 RP5 各组蛋白质，配制成浓度为 35mg/mL 的蛋白质溶液，调节 pH 至 7.00 和 12.00，蛋白质溶液与大豆油以 3：7 的比例进行乳化，乳化活性及乳化稳定性表示方法同上。

2.2.4 乳化层蛋白分离提取

取 40 mL 新制的鹅肝蛋白-植物油复合乳化液于 80 mL 离心管中，在 $10000 \times g$ 、4 °C 条件下离心 10 min，使得乳化液分成两层：上层为乳化层，下层为蛋白溶液层，收集上层，并向其中加入 3 倍体积的 Tris 缓冲液（0.1 mol/L、pH=7.0、含 2% SDS），利用匀浆机在最低速条件下将乳化层打散、混匀，将所得到的液体置于 -80 °C 冰箱冻存 12 h，然后在 4 °C 下解冻，再一次置于 -80 °C 冰箱中冻存 12 h，4 °C 下解冻，如此重复操作 3 次破坏乳化层。最后将混合液在 $10000 \times g$ 、4 °C 条件下离心 10 min，使乳化液水油分离。浮在上面的一层为脂肪层，下面的为分离得到的蛋白溶液，蛋白溶液应用蛋白组学来确定乳化层中的蛋白质种类和相对含量。

2.2.5 乳化层蛋白质质谱鉴定及组学分析

2.2..5.1 蛋白质前处理

原始样品 2000g 下离心 30 分钟，取 20mL 上清转移至新的 50mL 离心管中。加入等体积的 Tris 饱和苯酚，室温下振荡 15 min。样品在 2500 g 和 4℃ 下，离心 20 分钟，取下层 10mL 苯酚溶液转移到新的离心管中，注意避免触碰到中间层。苯酚溶液加入 4 倍体积的沉淀液。颠倒振荡离心管，在 -20℃ 条件下沉淀过夜。沉淀液配方：0.1 mol/L 乙酸铵的冷甲醇。离心沉淀蛋白质，2500 g 和 4℃ 下，离心 10 分钟。用预冷沉淀液漂洗沉淀，在 -20℃ 条件下沉淀 3 小时，离心获取沉淀，此步骤重复 2 次。蛋白沉淀使用 2mL 50mM 碳酸氢铵（ABC）溶解。定量，使用 BCA 法对蛋白进行定量。取 100μg 蛋白溶液转移至新 EP 管中。进行还原烷基化处理，加入 DTT 至终浓度 10mM，55 度水浴 1h。取出后，迅速加入 IAA 至终浓度 50mM，暗室静置 30 分钟。溶液转移至新的 10K Da 超滤管中，添加 200μL 50mM ABC 溶液，2500g 下离心置换溶液，重复 1 次后，添加 100μL 50mM ABC 溶液。

2.2..5.2 蛋白质的酶解

超滤管中加入 1μg/μl 的 Trypsin，每 100μg 蛋白质底物加入 1.0μg 的酶，37 度水浴 4h，然后补加 Trypsin 1.0μg，37 度 12h。更换新超滤外管，5000g 离心使溶液至超滤管底部，添加 200μl 50mM ABC 溶液继续超滤，收集超滤下来的肽段溶液（10KDa 以下的物质），真空冻干。

2.2..5.3 标记肽段除盐

使用 200μL 0.1%TFA，0.5%乙腈溶液溶解干燥后的肽段。使用 200μL 0.1%TFA，60%乙腈活化除盐柱。使用 400-600μL 0.1%TFA，1%乙腈溶液平衡除盐柱。将重溶样品加入除盐柱内，使样品缓慢流过除盐柱，肽段被除盐柱捕集，盐等其它非疏水性小分子流出舍弃。再添加 200μL 0.1%TFA，0.5%乙腈溶液清洗除盐柱，洗去残留盐类。添加 300μL 0.1%TFA，60%乙腈溶液，使液体缓慢流过除盐柱，将肽段洗脱下来，使用新 EP 管收集洗脱溶液。

将洗脱溶液冷冻干燥，去除乙腈。

2.2..5.4 质谱检测

离子源喷雾电压为 2.0kV，Q Exactive 质谱仪加热毛细管设定为 300℃，采用数据依赖模式自动在 MS 和 MS/MS 间切换采集。全扫描 MS 使用 Orbitrap 进行一级扫描，扫描范围为 m/z 350-1600，分辨率设定为 70,000 (m/z 200 处)。离子最大引入时间为 50ms，自动增益控制(Automatic gain control, AGC)设定为 5x10⁵，随后使用高能碰撞解离（Higher energy C-trap dissociation, HCD）对符合串联（MS/MS）碎裂条件的强度前 10 名母离子进行碎裂并用 orbitrap 进行扫描，扫描分辨率设定为 17,500。扫描范围根据母离子质荷比自动控制，最低扫描范围固

定为 $m/z=100$ 处，最高到 2000。进行 MS/MS 的最低离子强度值设定为 13,000。MS/MS 时离子最大引入时间为 150ms，AGC 控制设定为 2.0×10^5 ，母离子选择窗口设定为 2 道尔顿。对于 2、3、4 电荷数的离子进行 MS/MS 采集，动态排除设定为每个母离子在 10 秒内进行 1 次 MS/MS，之后排除 60 秒，27%的碰撞能量。

质谱仪检测肽段信号，参数如下：

表 2- 1 质谱参数

参数名称	参数值
离子模式	正离子模式
一级扫描范围	400-1600Da
二级扫描范围	依赖于一级母离子质荷比自动选择
毛细管温度	300 度
离子源电压	2000V
碎裂模式	HCD

Nano LC 的洗脱条件及梯度：

A 液成分：水，0.1%FA；B 液成分：乙腈，0.1%FA。色谱柱：类型 C18，规格 250mm*75mm，孔径 100Å，粒径 2μm。流速：300nl/min。样品溶解于 100μL A 相中，上样量 2μL，运行 2 小时液质联用分析。

表 2- 2 Nano LC 液相梯度

Time (min)	B 液比例
0	5%
5	5%
95	30%
105	80%
105.1	5%
120	Stop

2.3 鹅肝蛋白乳化相关功能性质测定结果

2.3.1 蛋白质溶解度

蛋白质的溶解度对其乳化特性发挥着极为重要的作用，而蛋白质乳化液的稳定性又取决于蛋白质-水相和蛋白质-油相的相互作用，作用越强，油-水界面上蛋白质膜的稳定性就越好。如图 2-1 所示，酸碱处理对鹅肝蛋白质的溶解度影响很大。在 pH7.00 时，AP 组鹅肝蛋白质的溶解度显著高于其余组蛋白质的溶解度 ($P < 0.05$)，而其余 4 组蛋白质溶解度间不存在明显差异；在 pH12.00 条件下，OP2 组蛋白质的溶解度显著高于其余 4 组，AP 组蛋白质的溶解度显著低于其余 4 组。

这也说明，鹅肝蛋白质经 pH11.00 溶解、pH5.50 沉淀后，蛋白质发生变性，蛋白质结构发生改变，降低了蛋白质在 pH 7.00 条件下的溶解度，提高了在 pH12.00 条件下的溶解度。在 pH7.00 时，经非酶磷酸化后鹅肝蛋白质的溶解度较非磷酸化的蛋白质略有提高，但不显著 ($P>0.05$)；而在 pH12.00 时，OP2 组磷酸化蛋白质的溶解度显著高于其余组蛋白的溶解度。

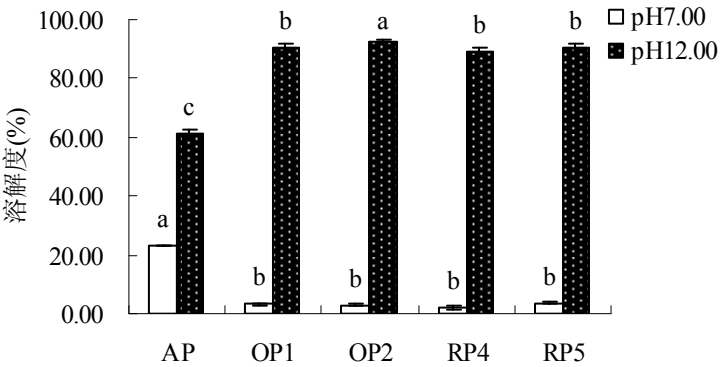


图 2- 1 蛋白质溶解度

注：同一处理不同的字母代表差异显著 ($P<0.05$)

2.3.2 蛋白质粒径

采用 Zeta-potential 纳米粒度及电位仪测定鹅肝蛋白质的粒径大小，结果如表 2-3 所示，鹅肝蛋白质经 pH 转换提取后，蛋白质粒径增大。在 pH7.00 时，AP 组蛋白质的分子粒径显著小于其他 4 组蛋白质的分子里粒径，磷酸化后，蛋白质的分子粒径减小，这可能是磷酸化后蛋白质的结构发生改变；在 pH12.00 时，蛋白质的分子粒径均显著减小，这可能是蛋白质分子在强的碱性条件下结构展开引起的。此条件下，AP 组蛋白质的分子粒径最小，pH 转换提取的蛋白质发生变性，分子粒度增大，由于磷酸化的作用，蛋白质分子的粒径再次增大。

表 2- 3 蛋白质粒径

样品	pH7.00		pH12.00	
	平均粒子直径/nm	PDI	平均粒子直径/nm	PDI
AP	1081.00±2.00 ^d	0.315±0.038 ^a	193.87±1.89 ^d	0.378±0.016 ^{ab}
OP1	2614.33±48.69 ^b	0.221±0.068 ^{ab}	198.60±3.47 ^c	0.399±0.019 ^a
OP2	1958.00±50.12 ^c	0.203±0.076 ^b	199.23±3.37 ^c	0.355±0.023 ^b
RP4	2838.67±56.37 ^a	0.243±0.062 ^{ab}	204.67±1.48 ^b	0.277±0.005 ^c
RP5	2575.33±69.15 ^b	0.0187±0.016 ^b	215.03±1.68 ^a	0.354±0.009 ^b

注：同列中小写字母不同表示在 $p<0.05$ 下差异显著。

2.3.3 蛋白质乳化特性

2.3.3.1 蛋白质浓度对乳化特性的影响

乳化活性指数表示的是单位质量的蛋白质所产生的界面面积，即单位质量蛋白质所产生的界面面积越大，其乳化活性指数越大，相应的乳化能力就越强。如图 2-2 所示，随着鹅肝蛋白质浓度的增加，参与乳化的蛋白质分子数量增多，乳状液中蛋白质分子间的间距减小，进而使得单个蛋白质分子有效的乳化表面积减小，蛋白质的乳化活性指数呈显著下降的趋势（ $P<0.05$ ）。在蛋白质浓度为 15mg/mL-35mg/mL 范围内，由于蛋白质浓度增加，蛋白质分子间间距减小，分子间斥力的增加，而单个蛋白质分子的有效乳化面积减小缓慢，从而使得乳化活性指数下降趋势变缓。

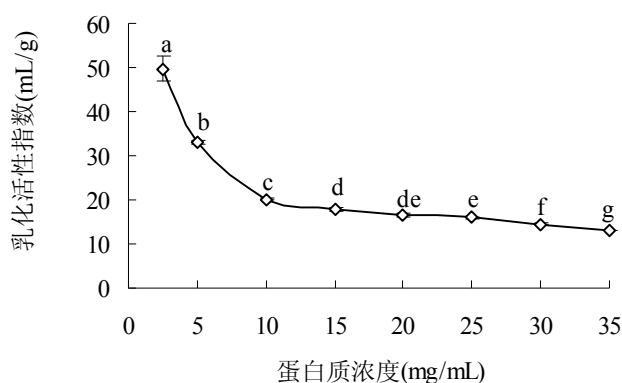


图 2-2 蛋白质浓度对乳化活性的影响

注：同一处理不同的字母代表差异显著（ $P<0.05$ ）

乳化稳定性是表征其乳化体系稳定性的重要指标，也是乳化类产品品质的重要体现。图 2-3 所示，随着鹅肝蛋白质浓度的增加，蛋白质乳化稳定性显著增加（ $P<0.05$ ）。鹅肝蛋白质溶解度决定了连续相中是否有足够的蛋白质完全包围大量的脂肪滴，若是蛋白质不充足，则乳化液体系会发生分层现象。随着鹅肝蛋白质浓度的增加，参与乳化的蛋白质分子数增多，进而使得乳化颗粒蛋白质膜的厚度增加，防止了小油滴的聚集，最终使得乳化液体系更加稳定。经典乳化学说认为，蛋白质浓度的增加使得蛋白分子在乳化界面上形成的界面膜的表面积增大，乳化液的稳定性也随之增强，这与印证了本研究的蛋白质浓度对乳化液体系稳定性影响的结果。

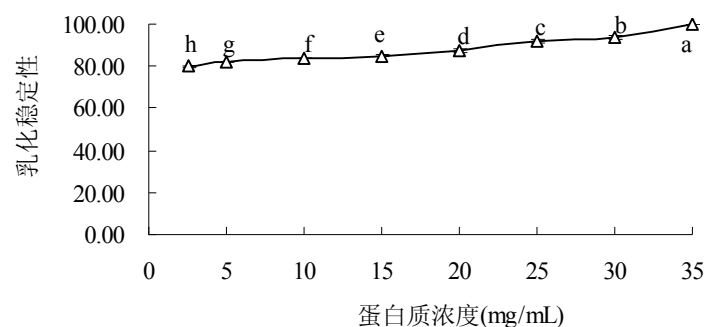


图 2-3 蛋白质浓度对乳化稳定性的影响

注：同一处理不同的字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

2.3.3.2 植物油比例对蛋白质乳化特性的影响

蛋白质溶液与植物油比例的改变决定了体系中参与乳化蛋白质的数量及单个蛋白质的有效乳化面积。如图 2-4 所示，随着蛋白质溶液所占比例的增加，鹅肝蛋白质的乳化活性指数呈显著的下降趋势。这可能是参与乳化的鹅肝蛋白质数量增加以及大豆油比例的降低使得单个蛋白质有效的乳化面积减小引起的。当蛋白质溶液与大豆油比例为 1 : 4 时，蛋白质乳化能力达到最大，随后显著下降，当两者比例为 3 : 2 或更高时，蛋白质的乳化能力趋于平稳。这主要是蛋白分子数量的增加及大豆油比例的减少，蛋白质分子间斥力增大，但单个蛋白质分子有效乳化面积减小较为缓慢，这也使得蛋白质乳化活性指数缓慢降低。

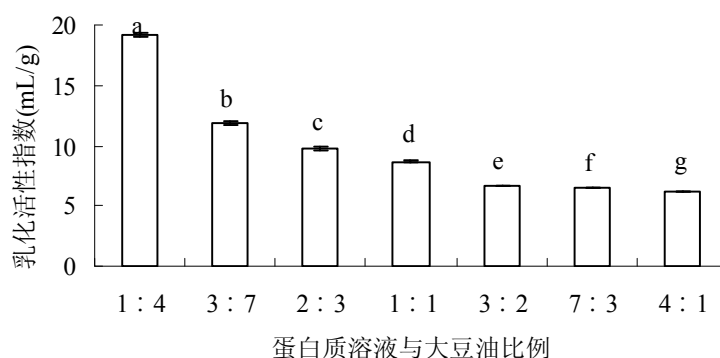


图 2-4 蛋白液与大豆油比例对乳化活性的影响

注：同一处理不同的字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

图 2-5 显示，随着蛋白质溶液与大豆油比例的增大，乳化液的稳定性显著下降 ($P < 0.05$)。蛋白质溶液与大豆油比例为 1 : 4 时，乳化液体蛋白质含量仅 7mg/mL，其在 4℃放置 4 天，乳化液仍未见到明显的分层，这说明在此条件下

蛋白质数量充足，能够最大程度地包围脂肪滴，使得乳化液体体系粘稠且稳定。随着蛋白质溶液所占比例继续增大，蛋白质数量过度增加，使得单个蛋白质分子有效的乳化面积减小，蛋白质分子间的斥力也随着蛋白质数量的增加而增大，这就使得乳化液体体系发生分层现象，甚至有少部分蛋白质析出。因此，蛋白质溶液与大豆油的比例也是影响乳化液性质的主要因素。

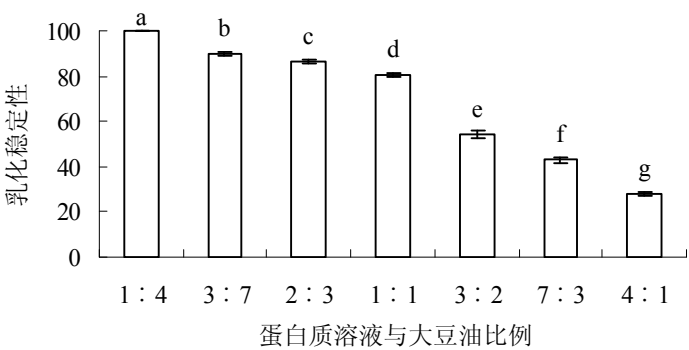


图 2-5 蛋白液与大豆油比例对乳化稳定性的影响

注：同一处理不同的字母代表差异显著 ($P<0.05$)

鹅肝蛋白质加工性能较差，呈现颗粒状，为提升鹅肝蛋白质的加工性能，对其进行磷酸化处理。图 2-6、图 2-7 显示，pH7.00 时，AP 组蛋白质的乳化活性指数和乳化稳定性均显著高于其余组蛋白质，其中磷酸化处理组蛋白质的乳化活性指数、乳化稳定性均显著高于相应对照组的蛋白质；当 pH 调至 12.00 后，磷酸化的蛋白质乳化活性指数显著高于相应对照组的蛋白质，均高于未经 pH 转变的 AP 组蛋白质 ($P<0.05$)。pH 值的增大提高了蛋白质的乳化特性，均显著高于 pH7.00 时的蛋白质乳化活性，但是除 AP 组蛋白质外，其余组蛋白质乳化液稳定性因 pH 的增加而增强。

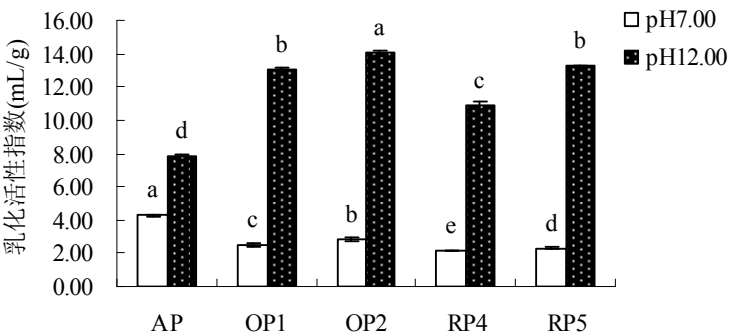


图 2-6 鹅肝蛋白质乳化活性

注：同一处理不同的字母代表差异显著 ($P<0.05$)

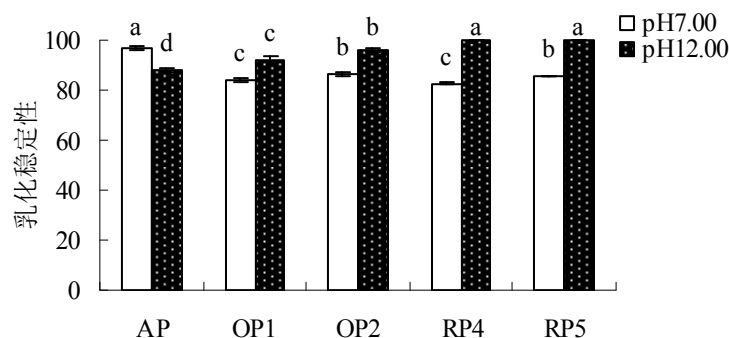


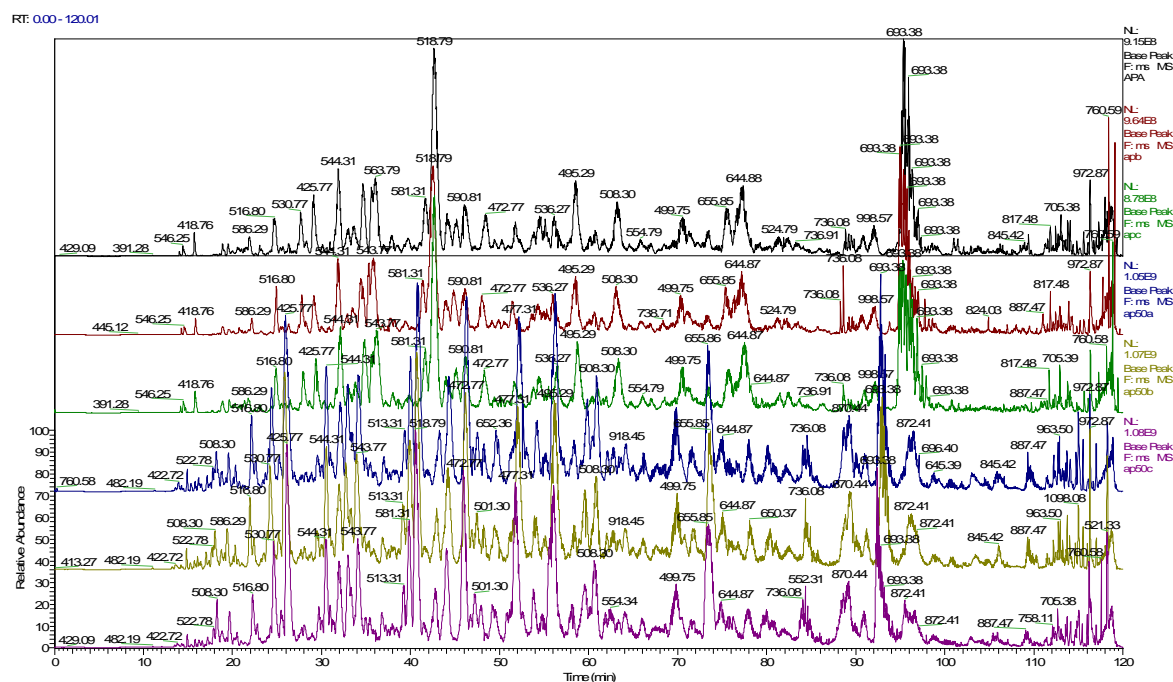
图 2- 7 鹅肝蛋白质乳化稳定性

注：同一处理不同的字母代表差异显著 ($P < 0.05$)

2.3.4 参与乳化蛋白质的质谱鉴定及组学分析

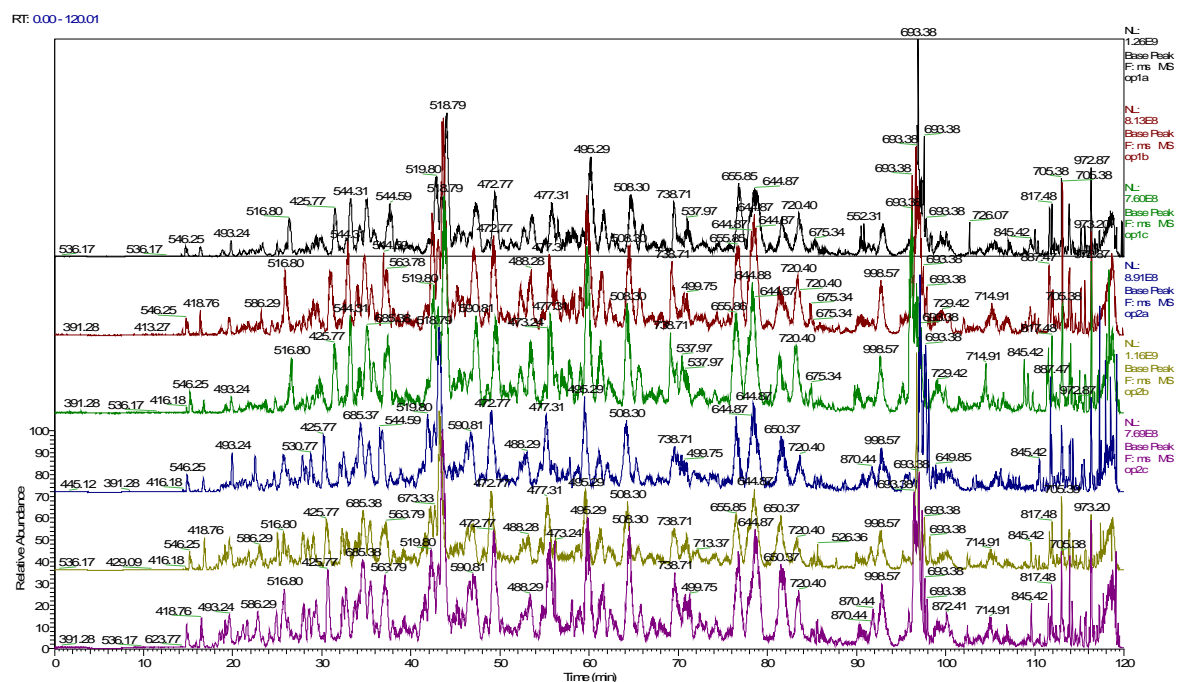
2.3.4.1 蛋白质鉴定质谱图

蛋白质样品经质谱扫描完毕，得到质谱信号总图，横坐标是洗脱时间，纵坐标是峰强度，如图 2-8 所示，为 18 个样品的质谱基峰色谱图。

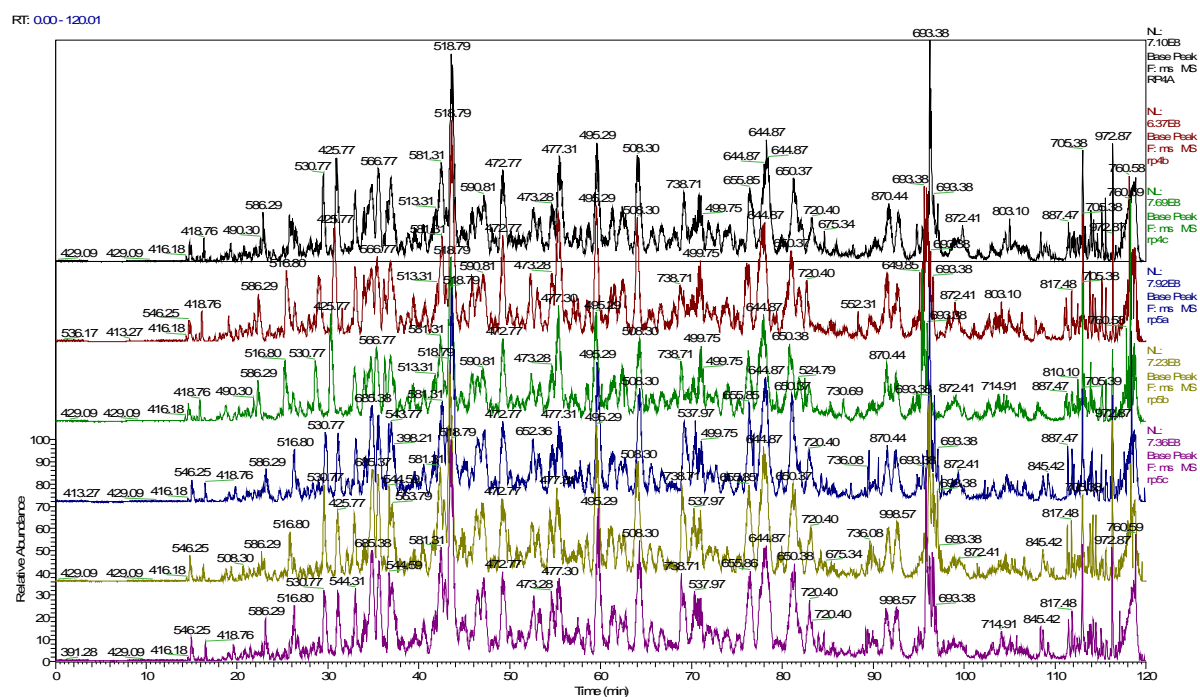


(a) AP50 和 AP 组蛋白质的质谱信号图

根据质谱原始文件 (raw 文件)，采用 MaxQuant (version 1.5.8.3) 进行搜索，得到全部串联谱图数 (All MS/MS spectra) 共 623892 个，匹配串联谱图数 (Matched MS/MS spectra) 共 171505 个，肽段种类 (Peptide) 为 10535 种，蛋白 group 总数 (Protein group) 为 1341。



(b) OP1 和 OP2 组蛋白质的质谱信号图



(c) RP4 和 RP5 组蛋白质的质谱信号图

图 2-8 蛋白质鉴定质谱信号总图

2.3.4.2 蛋白质鉴定结果

鉴定结果的过滤标准为肽段可信度 $\geq 95\%$ (protein unused ≥ 1.3), 鉴定到的蛋白至少包含一个特征肽段。6 组样品合并后共鉴定到 1325 种蛋白质 (蛋白质归并后), 其中共同蛋白 758 种。表 3 所示为蛋白质鉴定结果汇总表。由表可知, 原料肝提取蛋白质中检测到蛋白质种类 1148 种, 除 AP 组样品的蛋白质仅 944

种外，其余组参与乳化的鹅肝蛋白质种类均在 1000 种以上。这种现象的发生可能是 pH 的反复处理改变了蛋白质的结构所致。

表 2-4 蛋白质鉴定数目汇总表

Replication	AP50	AP	OP1	OP2	RP4	RP5
Repeat1	1035	847	925	945	939	950
Repeat2	1005	824	913	931	962	949
Repeat3	1008	792	926	930	945	942
Combination	1148	944	1054	1063	1072	1071

为了消除组间差异，对每组的三个重复进行了重复率展示，结果如图 2-9 所示。每组三个重复中相同蛋白数 AP、OP1、OP2、RP4、RP5 和原料肝 pH5.50 提取的蛋白质 AP50 组分别为 704、794、804、826、825 和 884 种。这个结果与表 1 的趋势一致。

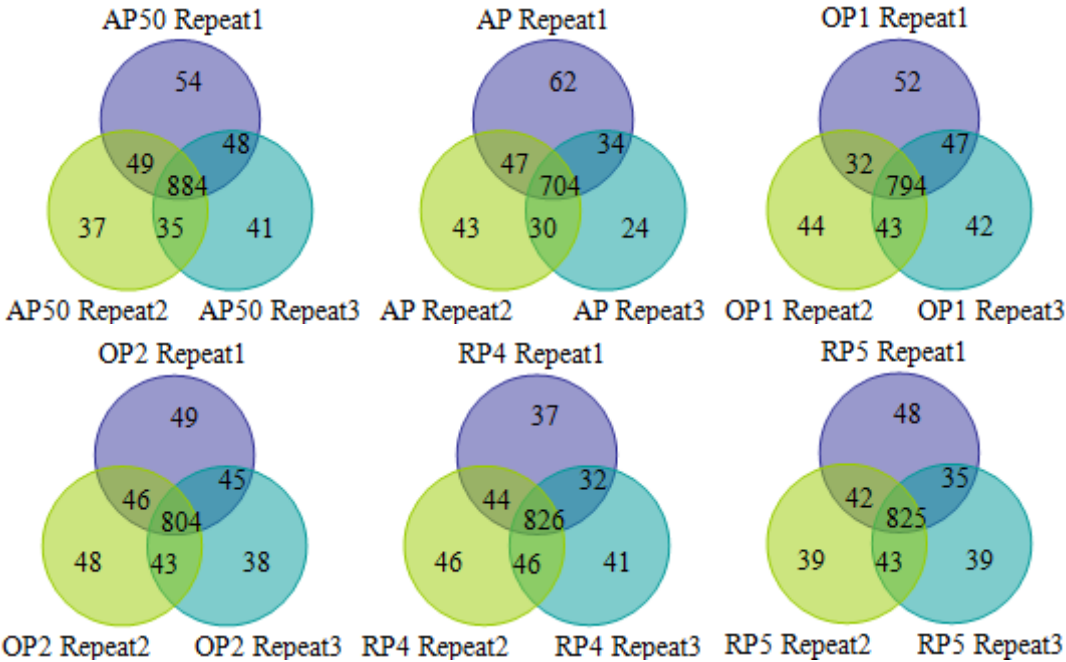


图 2-9 各组组间三次重复实验鉴定到的蛋白质重叠分析

2.3.4.3 提取蛋白质及乳化层中蛋白质组绝对定量

蛋白质组绝对定量指的是对某一特定生物样品内全部的蛋白质进行定量分析，从而判断该样品中各蛋白质的含量水平，进而得出各样品中含量较高的蛋白质。为了消除蛋白分子量不同对结果所产生的影响，本文采用基于强度的绝对蛋白定量方法（iBAQ）计算各样品内全部蛋白质的绝对含量值（iBAQ Value）。通过对质谱数据的分析，以此得出总蛋白质的相对定量结果，并记录通过蛋白质组学方法检测到的蛋白质以及在不同处理下各自含量的变化水平，由各组处理的前 20 个高丰度蛋白质信息可知，参与乳化的 AP、OP1、OP2、RP4 和 RP5 共 5 组中前 20 种高丰度蛋白质主要为结合蛋白质，在各组中排序位置有所差异，这可

能是其在各组中的含量不同所致，且有蛋白质在其他组中未检测到。而除杂质后 pH5.50 沉淀的鹅肝蛋白质 AP50 组前 20 种高丰度蛋白质与其余乳化层蛋白质在丰度排序上存在差异，其中蛋白质 sp|P01989 在各组中排序均为第一位，这说明此蛋白质在这些蛋白质中具有良好的乳化能力，且在不同处理下蛋白质乳化能力较其他蛋白质受到的破坏程度低。前 20 种高丰度蛋白质的具体名称及蛋白质在各组的排序情况如表 2-5 所示，采用不同颜色标注了出现频次最多的蛋白质，除去提取肝蛋白质组 AP50 外，5 组乳化层蛋白质组前 20 种高丰度蛋白质中出现频次最多的蛋白质共 11 种，增加了 tr|A0A0K1R5T3 和 tr|R0L1Y3 两种蛋白质。

表 2-5 每组处理中信号强度最高的前 20 种蛋白质排名

Rank	AP50	AP	OP1	OP2	RP4	RP5
1	sp P01989	sp P01989	sp P01989	sp P01989	sp P01989	sp P01989
2	tr R0KA48	tr R0KA48	tr R0KA48	tr R0KA48	tr U3J6E8	tr R0KA48
3	tr U3J6E8	tr R0KK84	tr U3J6E8	tr U3J1L1	tr U3J1L1	tr U3J1L1
4	tr T1WII5	tr U3J1L1	tr R0KK84	tr R0KK84	tr R0KA48	tr U3J6E8
5	tr R0KK84	tr R0KFP7	tr U3J1L1	tr U3IHG8	tr R0KK84	tr R0KK84
6	tr R0M210	tr U3IIS8	tr R0KFP7	tr U3J6E8	tr U3IHG8	tr U3IHG8
7	tr U3IIS8	tr R0K1T6	tr U3IHG8	tr R0KFP7	tr R0KPC7	tr R0KPC7
8	tr U3J1L1	tr A0A0K1R5T3	tr U3IIS8	tr R0L1Y3	tr R0L1Y3	tr R0KFP7
9	tr U3IHG8	tr R0KPC7	tr R0L1Y3	tr U3IIS8	tr R0M210	tr U3IIS8
10	tr R0K1T6	tr R0L1Y3	tr R0JKI4	tr R0M210	tr R0M714	tr R0L1Y3
11	tr R0KPC7	tr U3ICA9	tr A0A0K1R5T3	tr R0KPC7	tr R0J723	tr A0A0K1R5T3
12	tr U3J5F9	tr R0M714	tr R0M210	tr R0JKI4	tr R0M765	tr R0JH14
13	tr R0M714	tr R0M765	tr T1WII5	tr A0A0K1R5T3	tr U3IIS8	tr R0M714
14	tr R0KFP7	tr T1WII5	tr R0KPC7	tr R0JH14	tr A0A0K1R5T3	tr R0M210
15	tr R0J723	tr R0J723	tr U3J5F9	tr T1WII5	tr R0KFP7	tr R0JKI4
16	tr B4ZY90	tr R0JCY9	sp P04238	tr R0M714	tr R0JH14	tr R0K075
17	tr R0JH14	tr R0JH14	tr U3IHB0	tr R0JE50	tr R0JKI4	tr R0J723
18	tr U5YS24	tr U3J5F9	tr R0M714	tr R0LF09	tr A0A171R277	tr R0JE50
19	tr R0L8K3	tr R0M210	tr U3IVL6	tr R0J723	tr U3I726	tr R0LF09
20	tr R0M765	tr R0LF09	tr R0M765	tr U3IVL6	tr R0JE50	tr B4ZY90

注：表中出现频次为 6 的蛋白质用不同颜色标记。

如表 4 所示，从各组前 20 种高丰度蛋白质可以得出，前 20 种高丰度蛋白质在各组中的排序位置不同，即不同种蛋白质在各组中的含量不同。由于每种蛋白质的特性差异较大，其含量的多少会造成不同的加工特性。在各组前 20 种高丰度蛋白质中，仅出现在相应各组且未在其它组中出现的蛋白质分别是 AP50(tr|R0L8K3、tr|U5YS24)、AP(tr|R0JCY9、tr|U3ICA9)、OP1(sp|P04238、tr|U3IHB0)、RP4(tr|A0A171R277、tr|U3I726)、RP(tr|R0K075)；仅乳化组的前 20

种蛋白质中，仅出现在相应各组且未在其它组中出现的蛋白质分别是 AP(tr|R0JCY9、tr|R0K1T6、tr|U3ICA9)、OP1(sp|P04238、tr|U3IHB0)、RP4(tr|A0A171R277、tr|U3I726)、RP5(tr|B4ZY90、tr|R0K075)。

经 4 层纱布除杂和 pH5.50 沉淀的蛋白质 AP50 组中前 20 种高丰度蛋白质在其他组中都有出现，且乳化层蛋白质组 AP 的前 20 种高丰度蛋白质在其余 4 组乳化层蛋白质组中亦出现，据此，AP50 样品中含量最高的前 20 个蛋白在其它各组样品中的含量差异倍数的变化和 AP 样品中含量最高的前 20 个蛋白在其他 4 组乳化组蛋白质样品中的含量差异倍数的变化被分析（图 2-10 和图 2-11）。通过分析得出，大部分高含量的蛋白质在不同处理下都有不同程度的上调和下调。

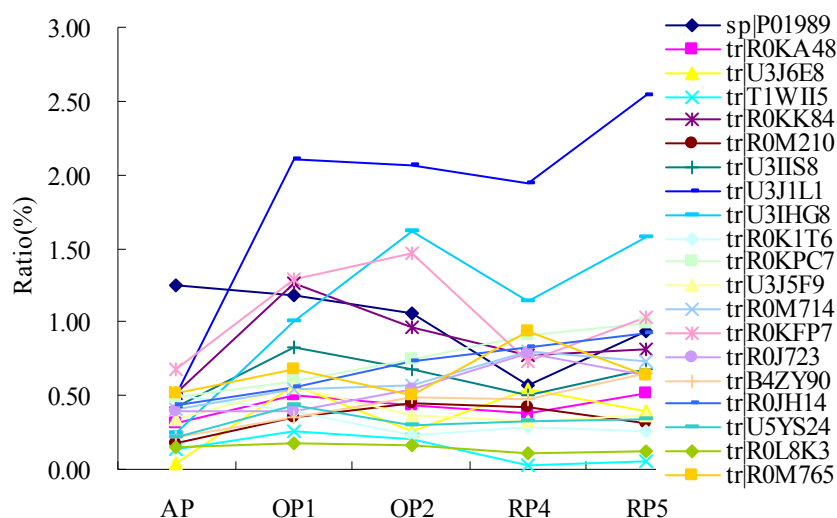


图 2- 10 AP50 样品中含量最高的前 20 种蛋白在其他样品中的含量比值分布

注：横轴为样品比较对，纵轴为比值，不同颜色线条表示不同蛋白质。

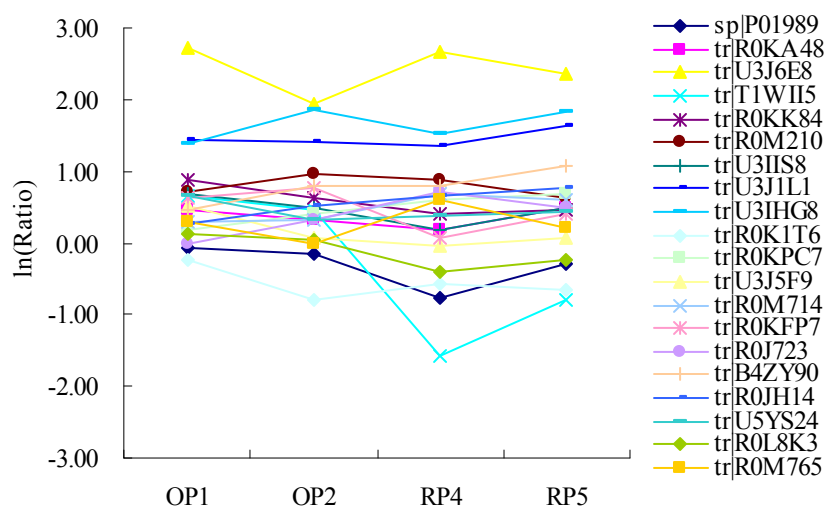


图 2- 11 AP 样品中含量最高的前 20 种蛋白在其他乳化层蛋白质组中的含量比值分布

注：横轴为样品比较对，纵轴为比值，不同颜色线条表示不同蛋白质。

鉴于蛋白质乳化能力受诸多因素影响，例如，蛋白质溶液的 pH、溶解度、蛋白质的浓度等均对蛋白质乳化液的乳化活性及乳化液稳定性有很大的影响，本文对蛋白组学鉴定得到的各组前 20 种高丰度蛋白质的理论等电点进行推算，结果如表 5 所示。在前 20 种高丰度蛋白质中，蛋白质等电点(Isoelectric point, PI)大部分介于 8.00 和 12.00 之间，部分介于 4.00 和 6.00 之间，仅极少部分蛋白质的 PI 在 7.00 附近。蛋白质在 PI 时，净电荷为零，溶解度最低，偏离 PI 时，溶解度会增大，有利于蛋白质的溶解和蛋白质参与乳化体系，增大单个蛋白质分子的有效乳化面积，提高乳状液体系的稳定性。从表 2-6 可见，除蛋白质 sp|04238、tr|R0JH14 和 tr|R0JKI4 外，其余参与乳化的前 20 种高丰度蛋白质的 PI 值均偏离或远离 pH7.00，蛋白质结构有一定程度的舒展，增加了蛋白质的溶解性，使得在此条件下蛋白质参与乳化的有效面积增加，提高了蛋白质的乳化能力以及蛋白质乳化液的稳定性。

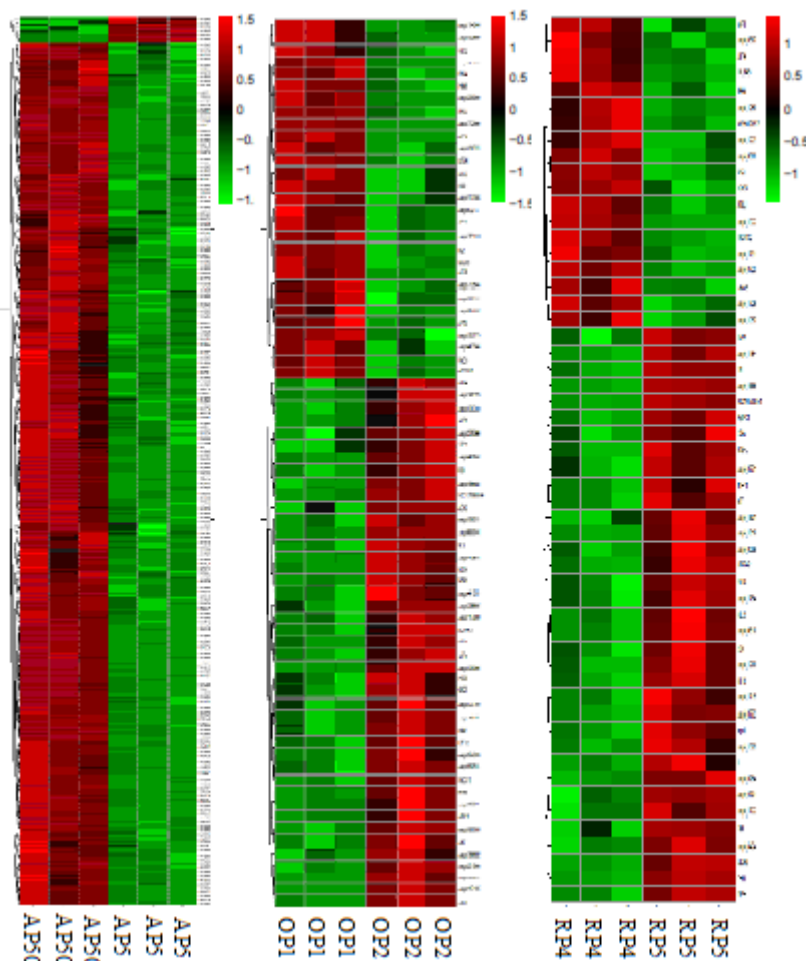
表 2-6 每组处理中信号强度最高的前 20 种蛋白质的理论等电点

Protein IDs	Theoretical PI	Protein IDs	Theoretical PI
sp P01989	8.54	tr R0L8K3	11.46
sp P04238	7.06	tr R0LF09	9.41
tr A0A0K1R5T3	9.73	tr R0M210	10.31
tr A0A171R277	8.28	tr R0M714	6.42
tr B4ZY90	4.80	tr R0M765	9.10
tr R0J723	4.89	tr T1WII5	8.52
tr R0JCY9	8.68	tr U3I726	10.55
tr R0JE50	6.38	tr U3ICA9	9.18
tr R0JH14	6.94	tr U3IHB0	9.86
tr R0JKI4	6.83	tr U3IHG8	8.74
tr R0K075	8.56	tr U3IIS8	10.69
tr R0K1T6	5.88	tr U3IVL6	8.68
tr R0KA48	11.36	tr U3J1L1	8.71
tr R0KFP7	8.87	tr U3J5F9	5.94
tr R0KK84	5.32	tr U3J6E8	9.40
tr R0KPC7	7.73	tr U5YS24	5.69
tr R0L1Y3	5.61		

2.3.4.4 样品间相对定量结果差异蛋白聚类分析

层次聚类分析能够直观地将相似度较高蛋白聚集到一起。若按列对样品进行聚类，不仅能够判断实验设计的重复性，还能够判断样品间的相关性关系；若按行对蛋白聚类，则能够发现某些能够聚集到一起的蛋白质具有相似的特征，或者某些比较特殊的蛋白，例如仅在特定条件下其在样品中的含量较高，而在其他样

品中含量较低或为 0。本研究利用统计学方法筛选出差异表达的蛋白，其中差异蛋白筛选标准为 $p\text{-value} < 0.01$ 且 $\text{fold change} < 0.67$ 或 $\text{fold change} > 1.5$ 。



2.3.4.5 磷酸化蛋白质的表征及鉴定

最为接近蛋白质的理论等电点。蛋白质鉴定结果显示，蛋白质 tr|U3IW62 尽在 AP50 和 OP1 组蛋白质中检测到，而蛋白质 tr|U3IFD3 仅在 OP1 组有检测到。这说明，蛋白质 tr|U3IFD3 在 pH 条件下提取过程中发生结构变化促进了蛋白质在 pH7.00 条件下能够参与蛋白质的乳化。与对照组相比，蛋白质磷酸化后，这些蛋白质含量出现上调或下调的趋势。这可能是非酶法磷酸化作用的广泛性决定，对蛋白质进行磷酸化反应，提高了蛋白质的乳化能力及乳化体系的稳定。蛋白质经非酶磷酸化处理后，蛋白质整体乳化能力上升的原因可能是部分磷酸蛋白含量的增加。

表 2- 7 蛋白质的长度、理论等电点及磷酸位点

Protein IDs	Length	Theoretical PI	Phospho (STY) site positions
tr U3J1L1	333	8.71	174
tr R0KFP7	221	8.87	37
tr A8RRQ6	415	7.62	237
tr R0LAD1	190	9.78	4
tr R0JSM9	732	5.00	263
tr U3IQ39	380	9.03	20
tr A0A068C605	295	9.39	7
tr R0LFA3	937	5.61	61
tr R0LCM7	273	7.20	18
tr U3IW62	522	9.53	110
tr U3IFD3	1979	5.44	668

上述 11 种磷酸蛋白质在提取鹅肝蛋白质种均被检测到，据此，5 组乳化组样品中检测到的磷酸蛋白质在提取鹅肝蛋白质样品中的含量差异倍数的变化被分析（图 6）。通过分析得出，不同磷酸蛋白质在不同处理下都有不同程度的上调和下调。经非酶磷酸化后，蛋白质 tr|A8RRQ6、tr|U3J1L1、tr|U3IFD3 等含量相对增加。这说明非酶磷酸化后磷酸化蛋白质含量的增加提高了蛋白质的乳化能力。

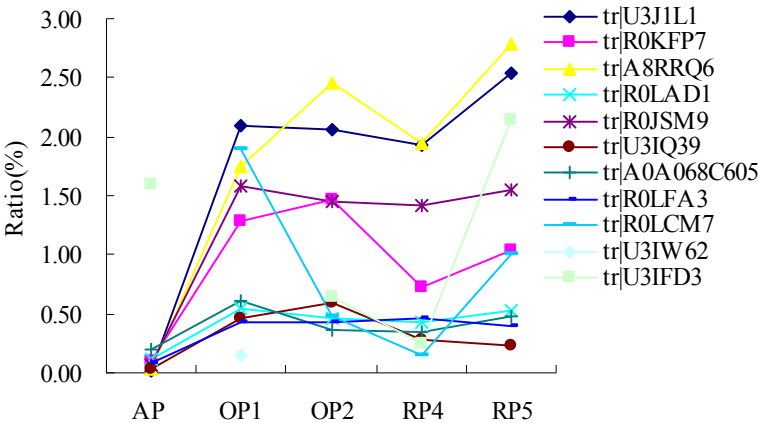


图 2- 13 组乳化组样品中磷酸-蛋白质在原鹅肝蛋白样品中的含量比值分布

注：横轴为样品比较对，纵轴为比值，不同颜色线条表示不同蛋白质。

3 基于组学和分子模拟的鹅肝蛋白的凝胶特性研究

3.1 研究方法

3.1.1 相图研究

鹅肝绞碎后冻存的样品 0-4℃解冻，按照鹅肝：水=1:6（w/w）的比例匀浆，然后两层纱布过滤，将滤液 pH 调节至 5.5 后，10000×g，4℃，离心 10min，取沉淀层。将蛋白浓度、pH、NaCl、加热温度这 4 个变量进行两两交叉的因素研究。蛋白浓度（mg/g）与 pH 作用的相图实验设置为：20℃~80℃线性升温（1℃/min），到达 80℃后保温 20min，蛋白浓度 130~170 mg/mL，pH2.0~7.0。蛋白浓度（mg/g）与 NaCl（mM/L）浓度相图实验设置为：20℃~80℃线性升温（1℃/min），到达 80℃后保温 20min，蛋白浓度 130~170 mg/mL，NaCl0~600mM/L。蛋白浓度（mg/mL）与温度（℃）相图实验设置为：20℃~X℃线性升温（1℃/min），到达 X℃后保温 20min。pH 固定在 7.0。NaCl 浓度（mM/L）与 pH 相图实验设置为：蛋白浓度固定在 150mg/g，温度固定在 20℃~80℃线性升温（1℃/min），到达 80℃后保温 20min。形成凝胶和未形成凝胶的判断标准为：倾斜小烧杯 45°，不流动为形成凝胶，以*表示；呈现流动状态代表形成凝胶以 o 表示。

3.1.2 光谱学研究

荧光光谱：含有芳香族氨基酸(色氨酸(tryptophan ,Trp)、酪氨酸(tyrosine ,Tyr)和苯丙氨酸(phenylalanine ,Phe))残基的蛋白质在 280nm 或 295nm 的激发光的激发下会产生荧光，这种荧光称为内源性荧光(天然荧光)。Trp、Tyr 和 Phe 由于其侧链生色基团的不同而有不同的荧光光谱。其中 Trp 的荧光强度最大，而 Phe 的荧光强度则很低，因此蛋白质的内源荧光主要是由 Trp 和 Tyr 残基形成的。同时在含有 Trp 和 Tyr 的蛋白质中，由于其分子发生了从 Tyr 残基到 Trp 残基的能量转移，从而导致 Tyr 残基的荧光猝灭和 Trp 残基的荧光增加，因而 Trp 最常被用作内源探针来研究蛋白质的结构。本研究，提取过后的鹅肝蛋白，调整浓度为 10mg/mL，分为三组，分别将 pH 调成 3、5、7。处理完毕后，将样品分别至于 50、55、60、65、70℃水浴锅中水浴加热 20min。加热过后的样品，冷却到常温后，利用相同 pH 且含有相同盐浓度的水稀释到 0.5mg/mL，然后点入黑色酶标版中，在激发波长 295nm，发射波长 320~420nm 间进行扫谱。

圆二色谱：在蛋白质分子中，肽链所形成的二级结构可分别形成 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角等特定的立体结构。这些立体结构都是不对称的。蛋白质的肽键在紫外 185~240nm 处有光吸收，因此它在这一波长范围内有圆二色性。几种不同的蛋白质立体结构所表现的椭圆值波长的变化曲线——圆二色谱是不同的。一般的， α -螺旋的谱是双负峰形的（峰位 190nm 处正峰，208nm 和 222nm 处负峰）， β -折叠是单负峰形的（195nm 有正峰，红移为反平行，蓝移为平行 β -折叠，在 215~217nm 处有负峰），无规卷曲在波长很短的地方出单峰（200nm 处有负峰，也在 218nm 处有弱正峰）， β -转角出峰一般在 180~190 负峰，200~205 正峰 225nm 处正峰。蛋白质的圆二色谱是它们所含各种立体结构组分的圆二色谱的代数加和曲线。因此用这一波长范围的圆二色谱可研究蛋白质中各种立体结构的含量。本研究的样品处理和测定条件为：提取过后的鹅肝蛋白调整浓度为 10mg/mL，分为三组，分别将 pH 调成 3、5、7。处理完毕后，利用相同 pH 且含有相同盐浓度的水稀释到 0.5 mg/ml。以各 pH 条件下含 100mM 盐的水溶液作为空白分别获得其相应的圆二光谱。然后利用系统自带的升温系统，待温度达到 50、55、60、65、70℃后，获得其相应的圆二色谱结果。

3.1.3 蛋白质质谱研究

鹅肝蛋白的提取方法同 2.2 中的 AP50 组，质谱检测方法同 2.2.5。

3.1.3 分子模拟研究

表面电势：先在 PDB 数据库下载蛋白的 pdb 文件，然后借助使用 PDB2PQR 软件将蛋白 PDB 格式转化为 PQR 格式，并分别设置 pH 为 3、5、7，最终每个蛋白得到 3 个 PQR 文件。在分子图形软件 Pymol（version 1.5.0.3）中打开蛋白 pdb 文件，然后在主菜单中选择 Plugin->APBS Tools2，在 Program Locations 中的 APBS binary location 中加载 apbs.exe 文件，在 Configuration 中的 Choose Externally Generated PQR 中分别加载不同 pH 的 pqr 文件，单击 Set grid 来进行空间格点设置，单击 Run APBS 按钮开启 APBS 计算。根据计算机运算速度，计算可能需要几分钟时间，计算结束后 Run APBS 按钮会灰化，最终在 Pymol 页面中会分别显示。APBS 的结果体现了蛋白在不同 pH 下的表面电势能图，有助于辅助分析蛋白在不同 pH 下的稳定性与活性，以及特定区域的电势变化情况。

疏水区域：先在 PDB 数据库下载蛋白的 pdb 文件，然后在 Pymol（version 1.5.0.3）软件中打开蛋白 pdb 文件，把蛋白显示为动态的表现形式，在程序界面的快捷菜单中选择 S->organic->sticks，为了突显疏水区域，可以对其设置颜色，红色显示为疏水区域。

二级结构：在 PDB 数据库中 3D View 中通过在 Display Options 菜单中设置为显示二级结构即可得到蛋白二级结构图。

3.2 鹅肝蛋白凝胶相图研究结果

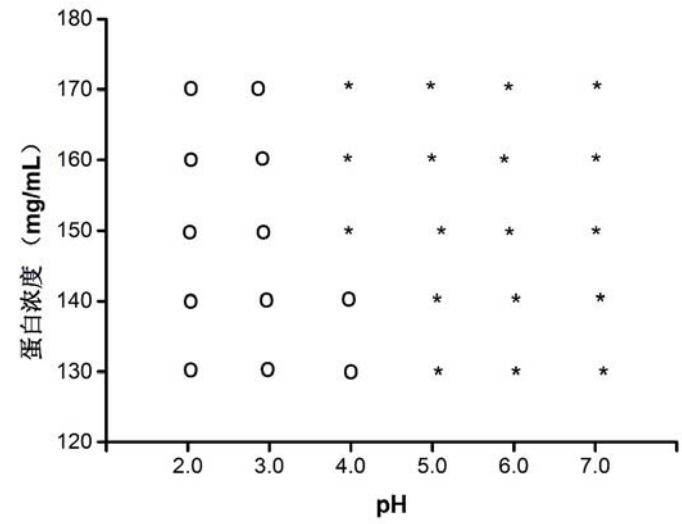


图 3-1 蛋白浓度 (mg/g) 与 pH 相图

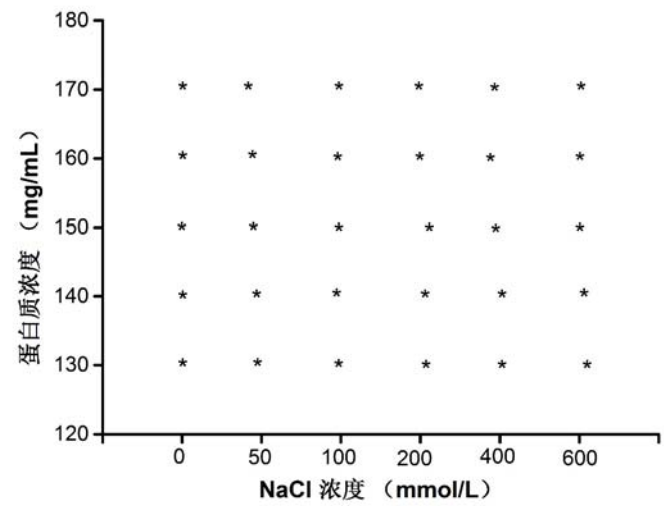


图 3-2 蛋白浓度 (mg/g) 与 NaCl (mM) 浓度相图

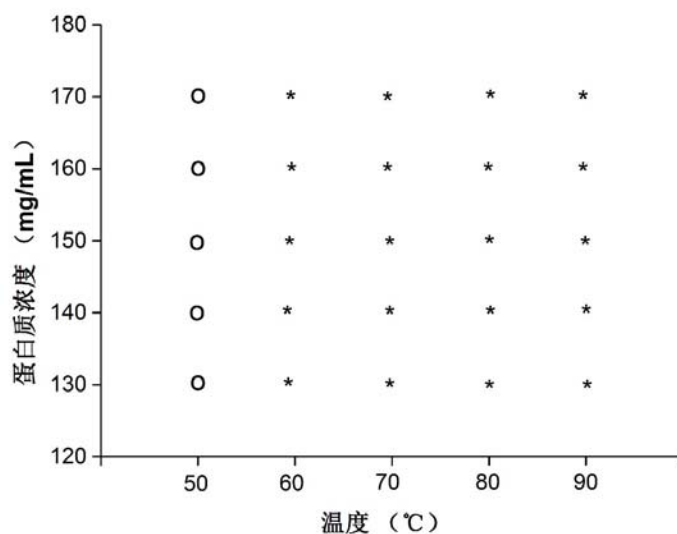


图 3-3 蛋白浓度 (mg/mL) 与温度 (°C) 相图

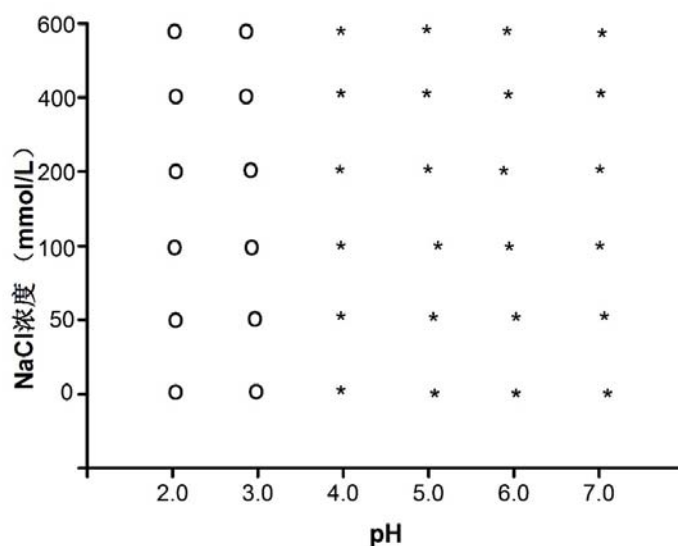


图 3-4 NaCl 浓度 (mM) 与 pH 相图

实验中发现, 鹅肝脏蛋白加热后呈现两种状态, 一种是流动态蛋白, 一种发生热凝固, 二者之间未见中间态。综合图 3-1 和图 3-2, 当 pH 高于 4.0 且蛋白浓度高于 140 mg/mL 时, 鹅肝脏蛋白在 20°C~80°C 线性升温 (1°C/min), 到达 80°C 后保温 20min, 在这样的条件组合下, 可形成稳定的蛋白凝胶; 如果 pH 降低到 3.0, 则蛋白浓度要相应提升到 150 mg/mL 及以上, 才能在相同的加热条件下形成凝胶。由蛋白浓度和 NaCl 这两个因素组成的相图可见, 在蛋白浓度 130 mg/mL 及以上的条件下, 在 0-600 mM 条件下 20°C~80°C 线性升温 (1°C/min), 到达 80°C

后保温 20min，均能形成蛋白凝胶，因此可以推断 NaCl 对凝胶形成与否的影响较小。由图 3-3 可见，温度在 60℃ 及以上是凝胶形成的先决条件。而由图 3-4 可见，在与 NaCl 的交互中，pH 在 3.0 以上是凝胶形成的先决条件。

3.3 鹅肝蛋白质光谱学研究结果

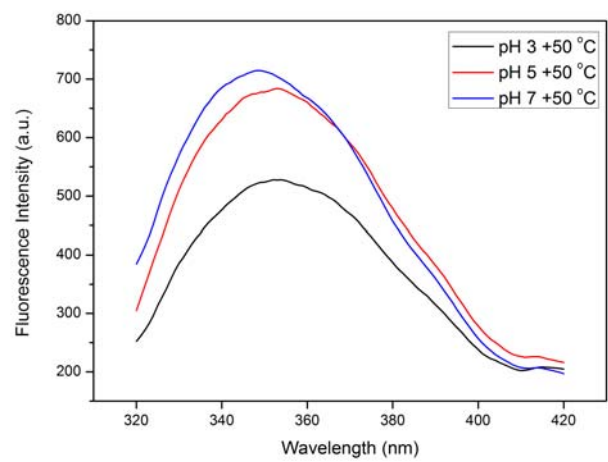


图 3- 5 pH 对 50℃ 加热蛋白的紫外荧光吸收性质的影响

以 50℃ 下各 pH 处理的鹅肝蛋白为例，由图 3-5 可见，相比 pH 7 处理条件下的鹅肝蛋白，pH 3 和 pH 5 下的最大荧光强度对应的荧光波长 λ_{max} 分别为 354,352，而 pH 7 为 349nm,这说明 λ_{max} 发生了红移，这说明具有内源荧光的色氨酸所处的环境变得更为极性了。在天然的蛋白质中，可产生荧光的芳香族氨基酸分子多处于蛋白质的内部，被多种非极性氨基酸残基包围，因此其所处的局部小环境的极性弱于蛋白质分子外部水溶液的极性。所以这也就是说色氨酸的侧链基团逐渐暴露于水溶液中，其所处的环境极性逐渐增加，因此蛋白质荧光发射峰的 λ_{max} 才会增大。在这里，则说明酸性处理使得鹅肝蛋白的三级结构发生了变化，使得原本盘绕在内部的氨基酸暴露出来，pH 为 3 时最为明显。其他温度下的各 pH 处理规律与此类似。

从表 3-1 可以看出，相比 pH，温度（50~70 °C）对于鹅肝蛋白质三级结构的影响则较小。

表 3- 1 不同温度和 pH 对鹅肝蛋白紫外荧光吸收的影响

温度 (°C)	50			55			60			65			70		
pH	3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7	3	5	7
最大吸收峰	354	352	349	354	355	349	355	355	349	353	355	350	353	355	346
强度	530	687	716	510	674	682	518	615	702	542	633	649	534	642	658

注：蛋白质浓度为 0.5mg/ml,采用 295nm 下波长激发

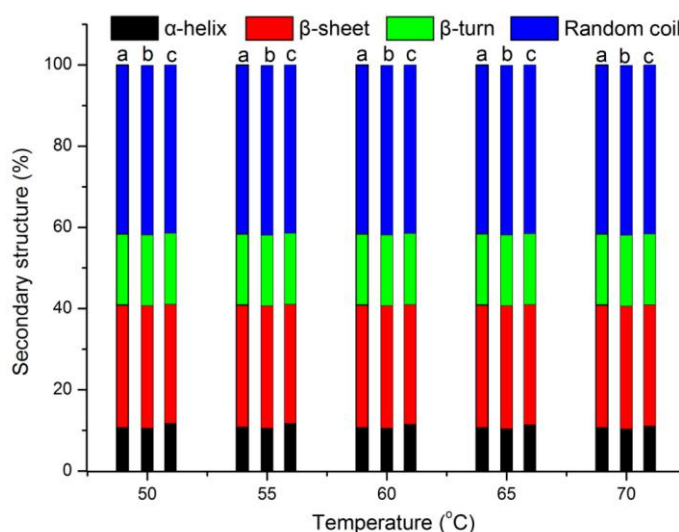


图 3- 6 温度和 pH 对鹅肝蛋白二级结构含量的影响

注：a,b,c 分别代表 pH 3, pH 5, 和 pH 7，蛋白浓度 0.5mg/ml，200-260nm 波长下结果。

由图 3-6 显示的根据 CD 结果推算的鹅肝蛋白二级结构比例可以清楚地看出，温度对鹅肝蛋白二级结构的影响很小，其二级结构含量基本保持不变。而 pH 则对鹅肝蛋白的二级结构则存在一定影响，相对于 pH 7 条件下的鹅肝蛋白，酸性条件下(pH 3、5)的鹅肝蛋白 α 螺旋含量有所降低， β 折叠、 β 转角、无规卷曲含量增加。但 pH 3 和 pH 5 条件下的鹅肝蛋白，两者二级结构变化则基本不变，这说明当 pH=5 时，即使进一步增加溶液的酸性其对于蛋白质二级结构的影响很小。

3.4 鹅肝蛋白质分子模拟结果

3.4.1 等电点沉淀回收鹅肝蛋白质谱鉴定结果

经质谱检测后及比对分析得出，原料鹅肝共可鉴别出1341种蛋白。其中信号强度最高的前20个蛋白见表3-2。前20种蛋白的分子量在10000~40000范围内，其中延长因子1- α 蛋白分子量最大，为50.15kDa。前20个蛋白分子具有不同的活性功能，第一种蛋白血红蛋白亚基的功能是氧气转运，而其他的蛋白具有结合蛋白质异二聚体活性、结合酶抑制剂活性、结合转运蛋白活性、结合核苷二磷酸激酶、催化活性、结合谷胱甘肽转移酶、结合磷酸烯醇丙酮酸羧激酶等功能。完整的肝脏中除了这些功能性蛋白质外，含量较为丰富的还有胶原蛋白，正常大鼠肝脏胶原蛋白占肝脏干重的0.55%或1mg/g组织湿重。但是由于本研究的肝脏蛋白的提取方法为破碎、过滤而后进行等电点沉淀，所以胶原蛋白并不在本研究的蛋白回收范围之内。

表 3-2 鹅肝蛋白质谱分析结果前 20 种蛋白

uniprot 数据库 ID 码	描述	Coverage (%)	分子量	分子功能	iBAQ 中 位数	变异系数 (%)
P01989 HBA_ANSAN	血红蛋白亚基 α -A OS = 雁 GN = HBAA	30.3	15436	结合氧转运蛋白活性	4.39E+09	6.76
R0KA48 R0KA48_ANAPL	组蛋白 H4 (片段) OS =阿纳斯绿头鸭 GN = HIST1H4G	53.4	11367	结合蛋白质异二聚体活性	1.07E+10	18.79
U3J6E8 U3J6E8_ANAPL	未鉴定的蛋白质 OS = 阿纳斯绿头鸭	59.8	9492	结合酶抑制剂活性	4.09E+09	45.84
T1WII5 T1WII5_9AVES	肝脏碱性脂肪酸结合蛋白 OS = 雁属 GN= fabp10	78.6	14105	结合转运蛋白活性	1.54E+09	5.71
R0KK84 R0KK84_ANAPL	ATP 合成酶亚基 β , 线粒体 (片段) OS =阿纳斯绿头鸭 GN = Anapl_17327	85.2	13795	结合 ATP	1.34E+09	8.02
R0M210 R0M210_ANAPL	组蛋白 H2B (片段) OS=阿纳斯绿头鸭 GN = Anapl_01019	20.6	13964	结合蛋白质异二聚体活性	1.11E+09	6.00
U3IIS8 U3IIS8_ANAPL	未鉴定的蛋白质 OS = 阿纳斯绿头鸭	25.8	13392	结合核苷二磷酸激酶活性	7.73E+08	5.31
U3J1L1 U3J1L1_ANAPL	甘油-3-磷酸脱氢酶 OS =阿纳斯绿头鸭 GN = GAPDH	66.4	35840	催化活性	7.16E+08	10.49
U3IHG8 U3IHG8_ANAPL	果糖 - 二磷酸醛缩酶 OS = 阿纳斯绿头鸭 GN = ALDOB	46.2	39379	催化活性	6.54E+08	11.34
R0K1T6 R0K1T6_ANAPL	表皮分化特异性蛋白 (片段) OS =阿纳斯绿头鸭 GN = Anapl_10413	18.7	17158		6.38E+08	3.86
R0KPC7 R0KPC7_ANAPL	L-乳酸脱氢酶 (片段) OS = 阿纳斯绿头鸭 GN = Anapl_07274	63.1	36755	L-乳酸脱氢酶活性	5.69E+08	5.56
U3J5F9 U3J5F9_ANAPL	未鉴定的蛋白质 OS =阿纳斯绿头鸭 GN = COX5A	52.7	16695	细胞色素 c 氧化酶活性	5.63E+08	10.76
R0M714 R0M714_ANAPL	甜菜碱 - 高半胱氨酸 S-甲基转移酶 1 (片段) OS = 阿纳斯绿头鸭 GN = Anapl_06456	47.9	44063	结合金属离子	5.46E+08	15.75
R0KFP7 R0KFP7_ANAPL	谷胱甘肽 S-转移酶 (片段) OS = 阿纳斯绿头鸭 GN =	54.3	25336	结合谷胱甘肽转移酶活性	5.22E+08	4.51

	LOC101797566						
R0J723 R0J723_ANAPL	磷酸烯醇丙酮酸羧激酶[GTP], 线粒体 OS =阿纳斯绿头鸭 GN = Anapl_18885	28.7	10193	结合磷酸烯醇丙酮酸羧激酶活性	5.07E+08	23.27	
B4ZY90 B4ZY90_ANSCY	脂肪酸合酶（片段）OS =鸿雁	44.9	17462		4.75E+08	39.28	
R0JH14 R0JH14_ANAPL	谷氨酸脱氢酶 1，线粒体（片段）OS =阿纳斯绿头鸭 GN=Anapl_04306	59.3	45024	结合谷氨酸脱氢酶（NAD+）活性	4.47E+08	5.40	
U5YS24 U5YS24_9AVES	载脂蛋白 A-1 OS =雁 GN = APOA1	62.1	30639	结合脂质	4.35E+08	9.88	
R0L8K3 R0L8K3_ANAPL	60S 核糖体蛋白 L35（片段）OS =阿纳斯绿头鸭 GN = Anapl_08024	26.3	9395		4.29E+08	18.24	
R0M765 R0M765_ANAPL	延伸因子 1- α （片段）OS =阿纳斯绿头鸭= EEF1A1	61.3	50157	结合翻译延伸因子活性	4.16E+08	18.93	

3.4.2 等电点沉淀回收鹅肝蛋白质表面电荷势能和疏水区域模拟结果

蛋白质是一类复杂的大分子化合物，其复杂的基础结构决定了其功能特性。蛋白质空间结构主要包括以下几个结构层次：二级结构、超二级结构、三级结构和四级结构。它的二级结构是指多肽链借助于氢键沿一维方向排列成具有周期性的结构构象，是多肽链局部的空间结构（构象），主要由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角等几种形式，它们是构成蛋白质高级结构的基本要素。改变蛋白质所在环境条件会使它们的高级结构发生变化，从而导致功能的变化。本课题以肉蛋白中起重要作用的肌球蛋白 7 作为对照，选取原料鹅肝蛋白质谱信号强度最高的前 20 个蛋白中血红蛋白亚基和组蛋白 H3.2，模拟它们三者的蛋白表面电荷势能图以及疏水区域、蛋白质二级结构。

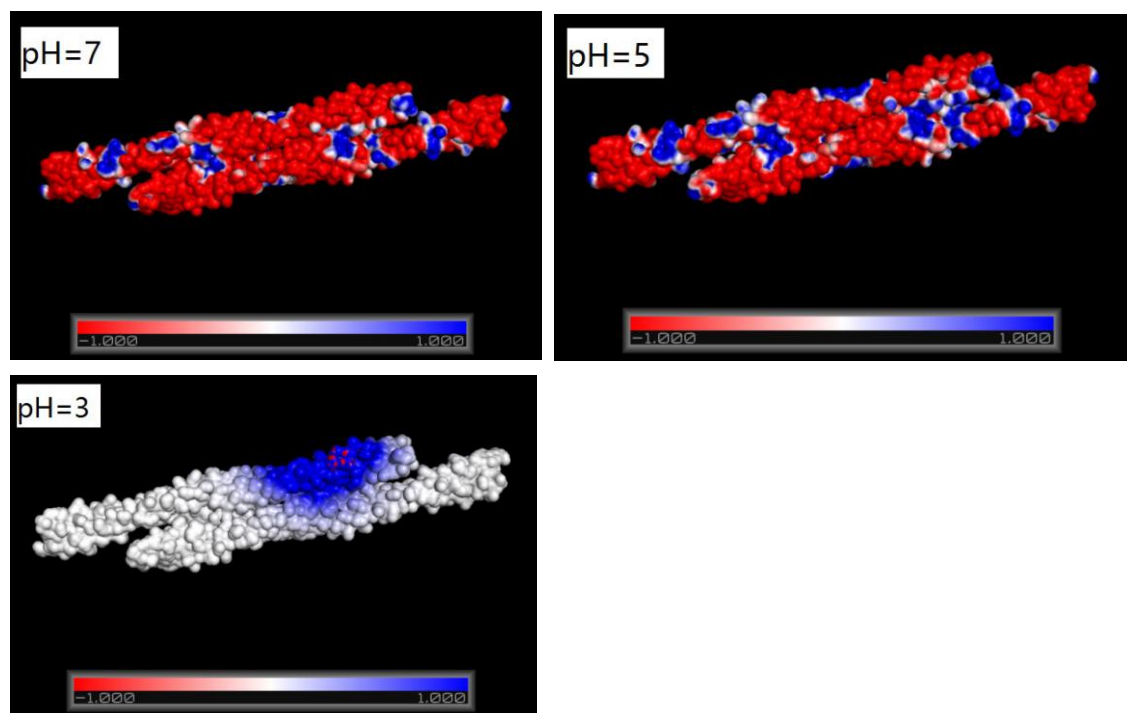


图 3- 7 Myosin-7（肌球蛋白 7）的表面电荷势能模拟结果

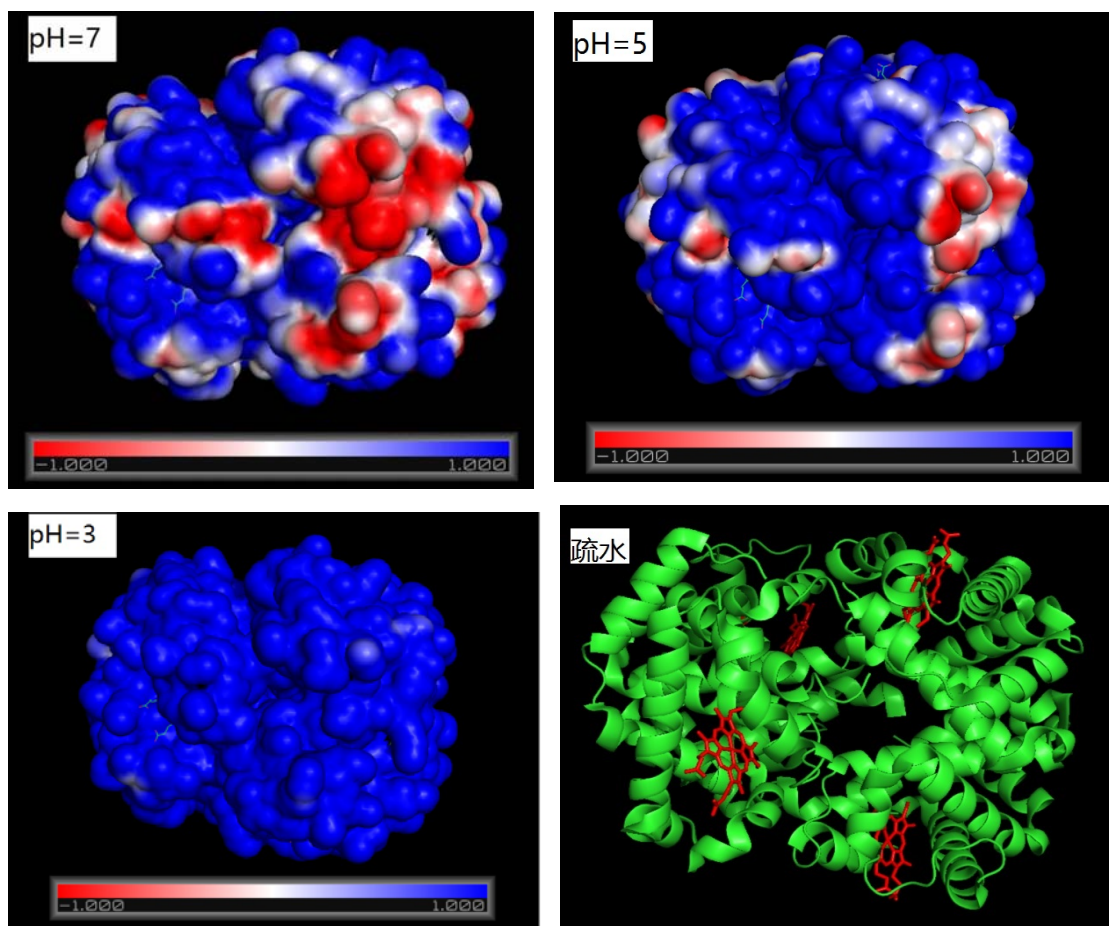


图 3- 8 Hemoglobin subunit alpha-A（血红蛋白亚基）的表面电荷势能及疏水区域模拟结果

注：红色代表疏水区域

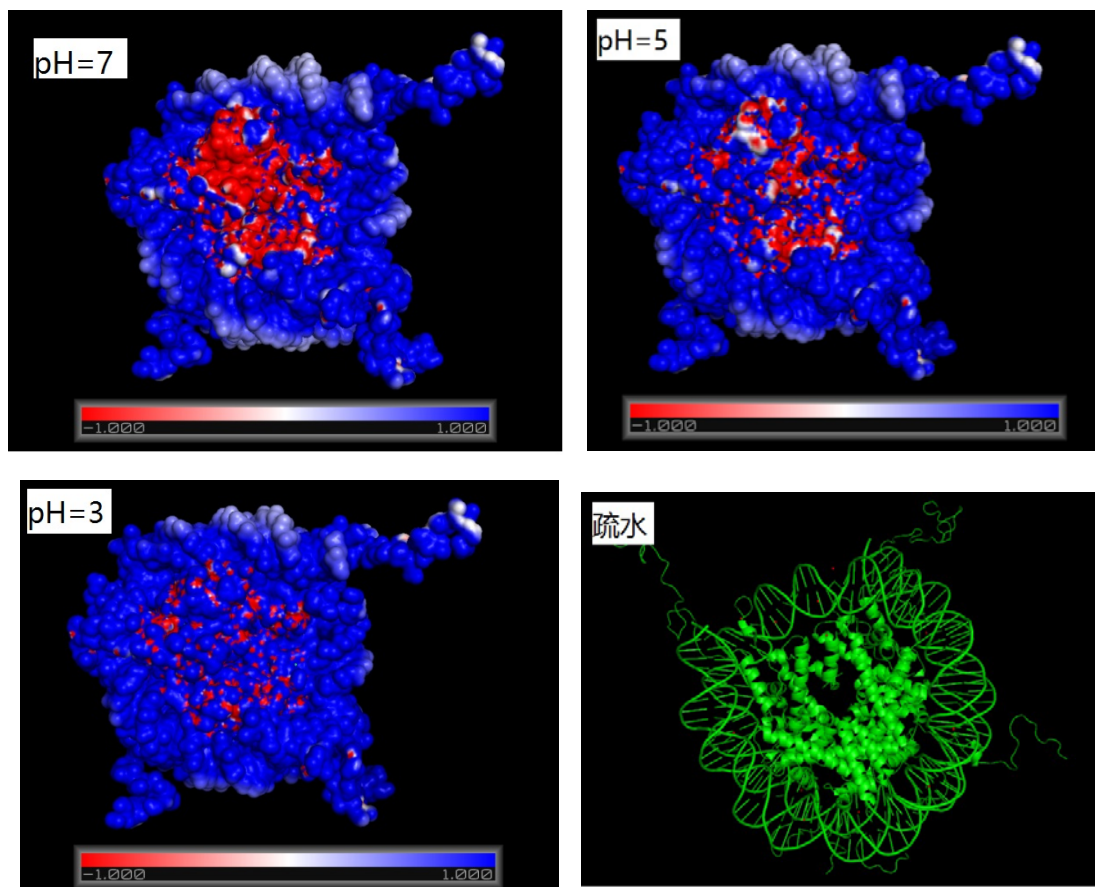


图 3- 9 Histone H3.2（组蛋白 H3.2）的表面电荷势能及疏水区域模拟结果

注：红色代表疏水区域

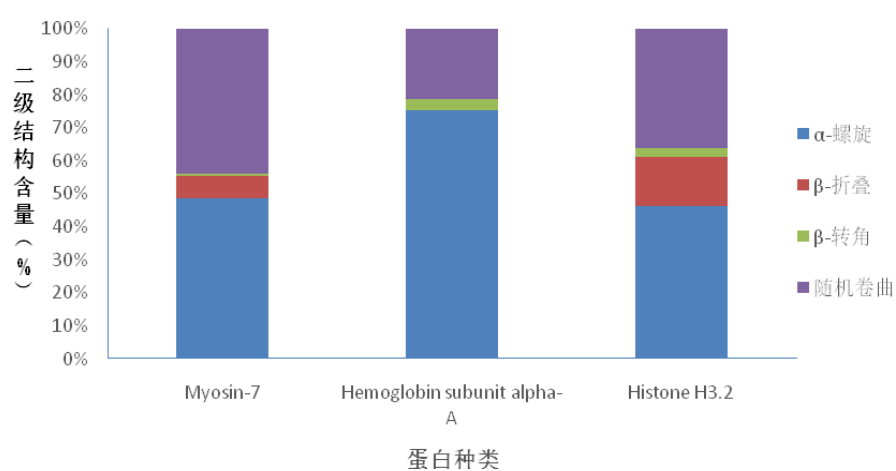


图 3- 10 三种蛋白的二级结构比例理论计算结果

Myosin-7



Hemoglobin subunit alpha-A



Histone H3.2



图 3- 11 三种蛋白的二级结构立体模拟结果

组蛋白 H3.2 是核小体的核心成分。核小体将 DNA 包裹并压制成染色质，限制了 DNA 需要 DNA 作为模板的细胞机制的可及性。因此，组蛋白在转录调节、DNA 修复、DNA 复制和染色体稳定性中起着核心作用。通过组合蛋白（也称为组蛋白代码）和核小体重塑的复杂的翻译后修饰来调节 DNA 可及性。组蛋白 H3.2 结构共有 10 个链，它们由 6 个序列唯一实体表示。其中 B 链组蛋白 H4 有 102 残基，二级结构中有 49% α -螺旋，6% β -折叠；C 链组蛋白 H2A.1 有 128 残基，二级结构中有 49% α -螺旋，5% β -折叠；D 链组蛋白 H2B.2 有 125 残基，二级结构中有 55% α -螺旋，3% β -折叠。组蛋白 H3.2 由 136 个氨基酸组成，起始氨基酸和终氨基酸分别是丙氨酸和赖氨酸。

血红蛋白亚基涉及从肺到各种周围组织的氧运输，分子量为 15436。血红蛋白亚基结构共有 4 个链，它们由 2 个序列唯一实体表示。其中 A 链血红蛋白有 141 残基，二级结构中有 75% α -螺旋；D 链血红蛋白有 146 残基，二级结构中有 78% α -螺旋。血红蛋白亚基由 142 个氨基酸组成，起始氨基酸和终氨基酸分别是丙氨酸和组氨酸。

在蛋白质分子中，存在带正电荷和带负电荷的基团，在蛋白质的空间结构与环境都适宜的情况下，正负离子之间的静电引力形成一种叫离子键的化学键，而过高或过低的 pH 值都可以破坏蛋白质构象中的离子键。即 pH 值能改变氨基酸侧链电荷分布，如果蛋白质净正电荷或净负电荷过多，则电荷间强烈的排斥作用会引起蛋白质各种次级键断裂，从而使蛋白质容易变性，所以不同的 pH 会影响蛋白次级键断裂程度，同时影响蛋白构象的变化程度。由模拟图 3-7、3-8 和 3-9 可见，三种蛋白质由于等电点有所差异，对于 pH 变化都呈现不同程度的相应。因此，本研究中鹅肝蛋白凝胶对 pH 的影响，可能是以蛋白间电荷作用为主的结果。

在受热和不同 pH 值影响时，其蛋白质构象会发生一定变化，各种二级结构会发生相互转变，而其热诱导凝胶在不同的环境条件下也会呈现不同的凝胶特性。在凝胶过程中，随着温度上升，氢键不稳定， α -螺旋逐渐解折叠展开，暴露了疏水性氨基酸，造成了疏水相互作用的变化。接着通过分子间暴露的疏水残基相互作用可能形成了折叠结构和其他的转角和无规则卷曲结构。由三个分子的二级结构模拟图 3-10 和 3-11 可见，血红蛋白的二级结构中 α -螺旋比例在 75%，组蛋白的 α -螺旋比例在 49%，对照蛋白肌球蛋白的 α -螺旋比例在 50%左右。而根据圆二色谱的实测结果，鹅肝蛋白的实际 α -螺旋比例仅在 10%~20%。由此可见，和肌球蛋白相比，鹅肝蛋白相对较差的凝胶性能，可能是因为采用的 pH 调整法进行等电点沉淀使得蛋白的二级结构受到破坏，因而无法完成加热时的 α -螺旋逐渐展开，乃至蛋白间疏水相互作用形成。因此，如何在保证蛋白得率的同时，尽

可能地对蛋白结构进行保护，从而不影响蛋白质的后续加工性质，是后续的研究方向之一。

4 鹅肝脏深加工新产品的开发

4.1 涂抹型鹅肝酱的研制

4.1.1 工艺流程

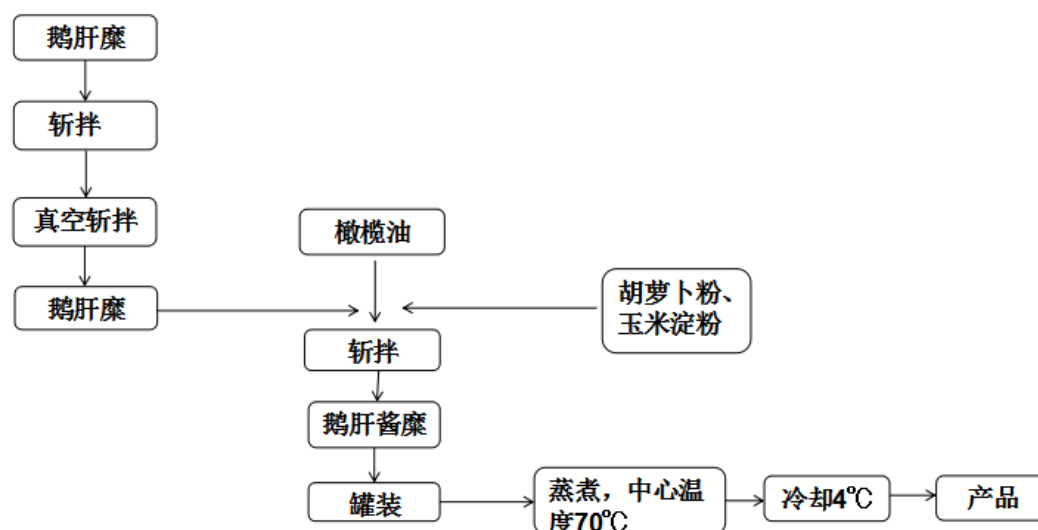


图 4-1 涂抹型鹅肝酱的生产工艺流程

4.1.2 操作要点

原料验收：对采购的原料进行验收，选择经卫生检验合格的新鲜鹅肝。剔除颜色、气味不正常，有变质现象的鹅肝。

原料整理：鹅肝在流动水中清洗，摘去血管、剔除骨头、筋腱和结缔组织。

鹅肝糜制备：将肝糊高速斩拌 8 min，控制肝糜温度在 4~7℃。

斩拌：将适当比例的橄榄油、胡萝卜粉、玉米淀粉倒入斩拌机中，与鹅肝糜一起低速斩拌 10 min，然后适当比例的冰水，中速斩拌至所有的原料都成为均匀的糊状。

罐装煮制：每 200 g 鹅肝糜分装到玻璃罐中，75℃水浴 1.5 h，直至中心温度达 70℃，冷却至 4℃即得到涂抹型鹅肝酱。

4.1.3 实验设计

4.1.3.1 玉米淀粉对鹅肝酱的影响

鹅肝酱的加工工艺如 4.1.1 所示。橄榄油用量 10%，水用量 70%，固定其他工艺参数，以玉米淀粉添加量（玉米淀粉所占比例为鹅肝、橄榄油、水重量之和的比例）为变量，设置为 0、2%、4%、6%、8%。

4.1.3.2 橄榄油对鹅肝酱的影响

鹅肝酱的加工 4.1.1 不变。水用量 70%，玉米淀粉添加量 6%，固定其他工艺参数，以橄榄油为添加量为变量，设置为 0、10%、20%、30%。

4.1.3.3 冰水对鹅肝酱的影响

鹅肝酱的加工工艺 4.1.1 不变。橄榄油用量 10%，玉米淀粉用量 6%，固定其他工艺参数，以冰水的添加量为变量，设置为 0、70%、90%、110%、130%。

4.1.4 检测方法

4.1.4.1 静态剪切流变学实验

上述试验单因素实验中不同配方的鹅肝酱，取适量置于流变仪上，刮去多余的样品。流变仪平板直径为 40 mm，间隙 1 mm，设置测试温度 25 °C，应变为 0.5%（在线性粘弹区内）使剪切速率从 0.1 s^{-1} 上升到 10^3 s^{-1} ，分析此过程中，鹅肝酱样品的剪切应力、粘度的变化情况。

4.1.4.2 温度扫描流变学实验

上述单因素试验中上述试验单因素实验中不同配方的鹅肝酱，取适量置于流变仪上，刮去平板上溢出的多余样品，并沿盖板缝加入液体石蜡以防止测试过程中水分蒸发影响测定结果。流变仪平板直径为 40 mm，间隙 1 mm，应变为 0.5%（在线性粘弹区内），频率为 0.1 Hz。设置升温程序，温度从 20 °C 升温到 90 °C，升温速度为 1 °C/min。

4.1.4.3 质构

用 TA—XT2i 型质构仪测定各配方的鹅肝酱。罐装鹅肝酱在 4 °C 下静置 24 h 后，取样（直径 6cm、高 10cm、200g）在中心测定。每个处理取 5 罐。选用 TPA 模式；夹具选择：P50 探头；测试前速度：2.0 mm/s；测试速度：5.0 mm/s，测试后速度：5.0 mm/s；穿刺距离：20mm；接触力：5 g；记录速率：200 PPS。

4.1.4.4 感官评定

表 4- 1 鹅肝酱感官评定表

指标	感官评价	分数（分）	打分
色泽	有光泽，酱体呈浅棕色	7-10	
	光泽稍暗，色泽较深	5-7	
	无光泽，颜色很深	1-4	
风味	有鹅肝特有的香味，无腥味	7-10	
	鹅肝特有的香味不突出，稍有腥味	5-7	
	无鹅肝特有香味，腥味重	1-4	
形态	酱体质地均匀，无水析出，涂抹性好	7-10	
	酱体略粗糙，稍有水油析出，涂抹性稍差	5-7	
	酱体粗糙，水油析出严重，涂抹性差	1-4	
口感	口感细腻，无颗粒感	7-10	
	口感稍粗糙，稍有颗粒感	5-7	
	口感很粗糙，颗粒感较重	1-4	
总体可接受性	总体感觉较好	7-10	
	总体感觉一般	5-7	
	总体感觉较差	1-4	

参照 Abu-Salem 等（2010）的方法，稍有改动。感官评定采用 10 分制，10 分代表品质最好，可接受程度最高，1 分代表最低，可接受度最差。评定在专门的感官评定室进行。15 位评定员每位评定员前面随机摆放编号不同的样品，每评定一次，用温水漱口，已消除上一个样品对人体感官的影响。

4.1.5 涂抹型肝酱实验结果分析

4.1.5.1 玉米淀粉添加量对鹅肝酱流变性质、质构和感官评定的影响

4.1.5.1.1 流变性质

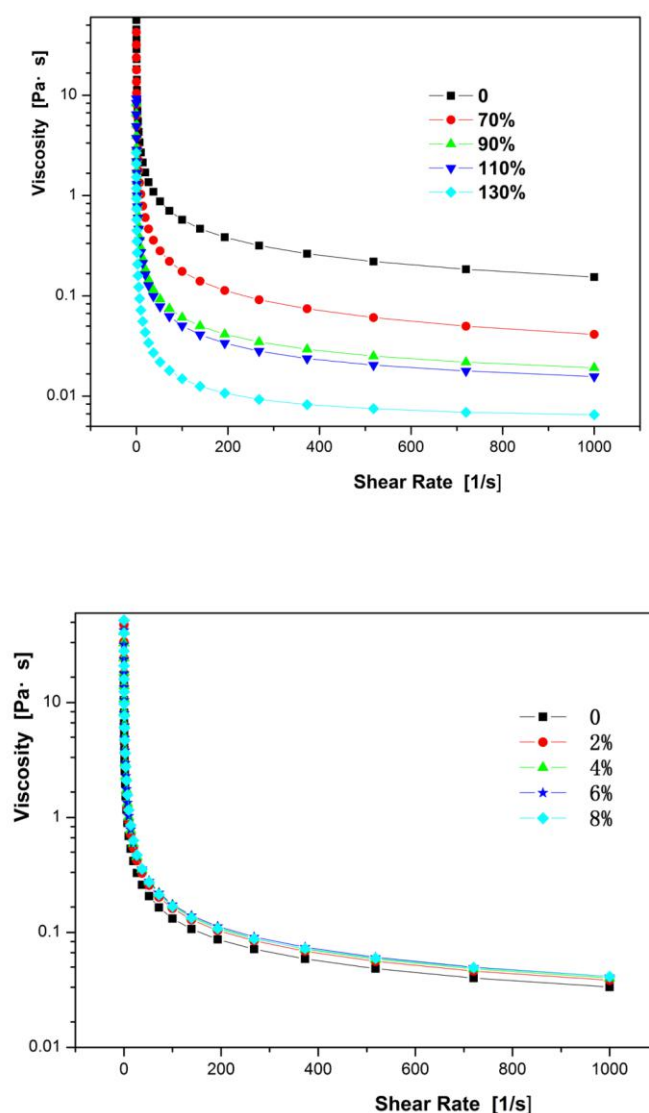


图 4-2 不同淀粉添加量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响

由静态剪切流变结果图 4-2 可知，鹅肝酱中分别添加 0%、2%、4%、6%、8% 的玉米淀粉，得出剪切速率-剪切应力的关系如图 1a 所示。不同玉米淀粉添加量的鹅肝酱剪切速率和剪切应力呈非线性关系。随着剪切速率的增加，鹅肝酱中的颗粒成分间距减小，作用力加大，形成的凝胶网络结构更加紧密，更不容易被破坏，所以随着剪切速率的增加，剪切应力也逐渐增加。而在同一剪切速率下，随着玉米淀粉添加量的增加，剪切应力也随之增加，这是由于玉米淀粉加入鹅肝酱体系中增加了分子间的作用力，从而使体系更加稳定。添加 4%、6% 和 8% 的玉米淀粉时剪切应力曲线基本重合。

鹅肝酱的粘度随着剪切速率的增加而减小如图 4-2 所示，呈现出假塑性流体性质，由图可看出鹅肝酱的粘度随着玉米淀粉的增加而增加，这可能是由于鹅肝

酱中因淀粉的加入使得体系更加稳定。而在高速剪切条件下粘度趋向于一定值，这是因为在高转速剪切作用下，酱体剪切变稀，分子间的作用力被破坏，变为流体状态，粘度值基本不变。添加 4%、6%和 8%的玉米淀粉时粘度曲线基本重合，这与剪切应力-剪切速率曲线的结果一致。

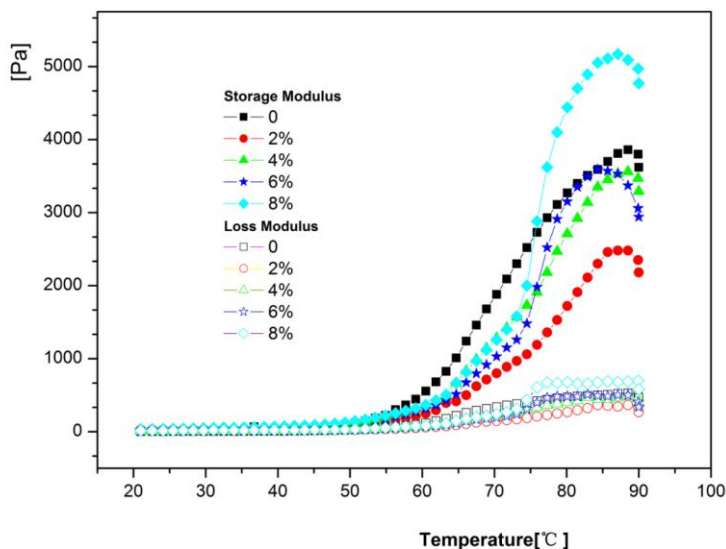


图 4-3 不同淀粉添加量下，加热温度对流变模量的影响

在鹅肝酱中分别添加 0%、2%、4%、6%、8%的玉米淀粉并对其进行温度扫描，根据扫描得出的储能模量 G' 和损耗模量 G'' 值来评价酱体的总体特性。由图 4-3 可知，加热初始阶段鹅肝酱 G' 值和 G'' 值基本不变，加热一段时间体系达到一定温度后，鹅肝酱体系的 G' 值和 G'' 值显著升高，达到最大峰值后曲线开始下降。

所有处理组的 G' 值和 G'' 值在 55 °C 附近均呈现上升趋势，这可能是由于随着温度的升高鹅肝酱颗粒逐渐吸水膨胀，当体系达到糊化温度时，颗粒大量吸水，导致体系膨胀， G' 值和 G'' 值达到最高峰时，鹅肝酱颗粒被紧密包裹在淀粉形成的凝胶网络体系中，因此酱体的弹性和粘性不断增大。温度继续升高，颗粒间的碰撞加剧，使得凝胶网络结构的部分氢键断裂开，从而使 G' 值和 G'' 值变小。

随着玉米淀粉的添加 G' 值和 G'' 值都在增大，当添加量达到 8%时，两值高于对照组。 G' 值在 55°C 之后明显高于 G'' 值，这说明酱体为弹性占优势的粘弹性体系，而玉米淀粉的添加并未改变鹅肝酱的这个性质。鹅肝酱在经较高温度时，其内部组织结构的变化能在一定程度上反映产品的稳定性，同时也为鹅肝酱在生产运输过程中对温度的耐受能力提供一些参考价值。

4.1.5.1.2 质构结果分析

表 4-2 不同玉米淀粉添加量下肝酱的质构测定结果

处理	硬度(N)	弹性 (mm)	内聚性(-)	黏性(N)	咀嚼性 (J/1000)
0%	0.891±0.852 ^c	0.697±0.024 ^a	0.508±0.053 ^a	0.192±0.891 ^c	0.099±0.113 ^c
2%	8.489±1.487 ^b	0.693±0.008 ^a	0.525±0.032 ^a	11.186±0.530 ^{ab}	10.869±0.305 ^{ab}
4%	9.772±0.82 ^b	0.689±0.007 ^a	0.501±0.014 ^a	8.997±0.577 ^b	8.541±0.436 ^b
6%	20.210±0.956 ^a	0.688±0.010 ^a	0.539±0.031 ^a	18.703±0.577 ^a	18.102±0.106 ^a
8%	21.809±0.670 ^a	0.691±0.006 ^a	0.502±0.029 ^a	16.305±0.853 ^{ab}	15.927±0.688 ^{ab}

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

鹅肝酱主要作为涂抹用酱，决定其涂抹性的重要质构指标为硬度和黏性，由表 4-2 可知，未添加玉米淀粉的鹅肝酱硬度和粘性指数的绝对值都较小，酱体不够坚实较易流动。而随着玉米淀粉的添加，两者绝对值都呈上升趋势。说明玉米淀粉的添加使肝酱质地变得更加坚实，避免了涂抹时坍塌流动，同时也使肝酱的内聚性升高到较好的范围内，有利于涂抹性的改善。随着玉米淀粉添加量的增大，不同处理组的弹性，内聚性与对照组无显著差异，硬度随着淀粉添加量的增多而增大，其中 6%与 8%的添加量之间无显著差异，4%与 2%、6%之间无显著差异。黏性与咀嚼性 6%的处理组最大，且与其他处理组由显著性差异。然而，玉米淀粉添加 10 % 时，会使得硬度较大，所需涂抹力较大，同时粘性指数的绝对值较大，过强的粘着性容易使鹅肝酱粘附于涂抹工具上，而且也不易在口中分散影响咀嚼和吞咽，根据婴幼儿发育的特点来看，选择硬度，咀嚼度适宜的产品来喂食。由此结果可看出，选择 6%的玉米淀粉添加量最为合适。

4.1.5.1.3 感官评定结果分析

表 4-3 不同玉米淀粉添加量下肝酱的感官评定结果

处理	色泽	风味	形态	口感	总体可接受性
0%	7.71±0.265 ^b	8.367±0.208 ^c	7.00±0.265 ^b	7.00±0.361 ^b	6.47±0.306 ^b
2%	8.83±0.152 ^a	8.53±0.351 ^{bc}	8.80±0.361 ^a	9.03±0.208 ^a	8.93±0.321 ^a
4%	8.86±0.361 ^a	8.77±0.153 ^{abc}	8.67±0.551 ^a	8.80±0.361 ^a	8.83±0.503 ^a
6%	8.80±0.265 ^a	8.97±0.115 ^a	8.63±0.351 ^a	8.73±0.503 ^a	8.80±0.400 ^a
8%	8.7±0.416 ^a	9.00±0.265 ^a	8.87±0.208 ^a	8.77±0.3321 ^a	8.77±0.611 ^a

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

鹅肝酱处理组和对照组之间在风味、形态、口感和整体可接受性之间存在显著差异，如表 4-3 所示。加入玉米淀粉和为加入玉米淀粉产品相比，有更高的感官评分值，并且整体可接受性也较高（ $P < 0.05$ ）。因此，玉米淀粉能够掩盖鹅肝的腥味提高可涂抹型肝酱的感官评分。然而，除了风味之外，所有其他感官评分没有显著差异（ $P > 0.05$ ）。

4.1.5.2 橄榄油对鹅肝酱流变、质构和感官性质的影响

4.1.5.2.1 流变性质

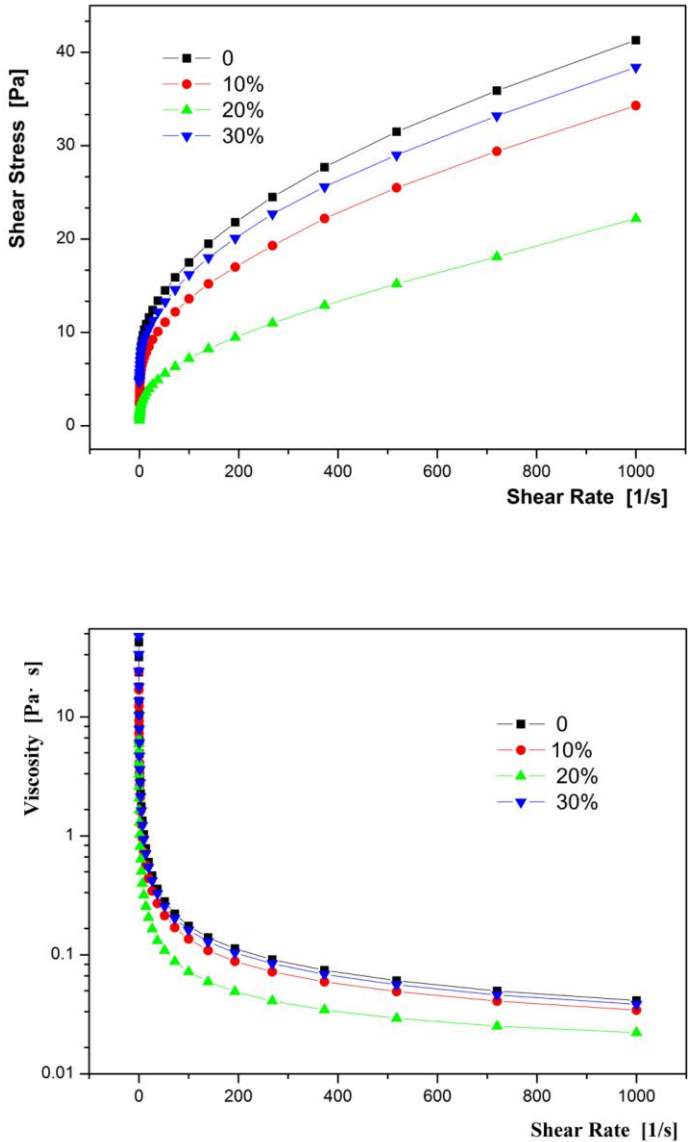


图 4-4 不同油脂添加量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响

不同油脂添加量的鹅肝剪切速率与剪切应力和表观粘度关系如图 4-4 所示，随着剪切速率的增大，剪切应力不断增大。在同一剪切速率下，随着油脂含量的上升剪切应力下降，表现为剪切变稀。这可能是因为受剪切速率变大的影响，水分和油滴颗粒分离，使得分子间相互作用力减小，流动阻力减弱，粘度降低。20%的剪切应力值与其他组相比最小，这可能是因为 20%的油脂添加量使得乳化油滴之间的聚集状态最差，而增加油脂添加至 30%，可因为油滴之间的互相挤压作用使得剪切应力值提升。

剪切速率与剪切应力和粘度呈非线性关系。随着剪切速率的增大，粘度值呈下降趋势，在同一剪切速率下，随着油脂含量的上升粘度下降，表现为剪切变稀。这与剪切速率-剪切应力曲线得出的结果一致。

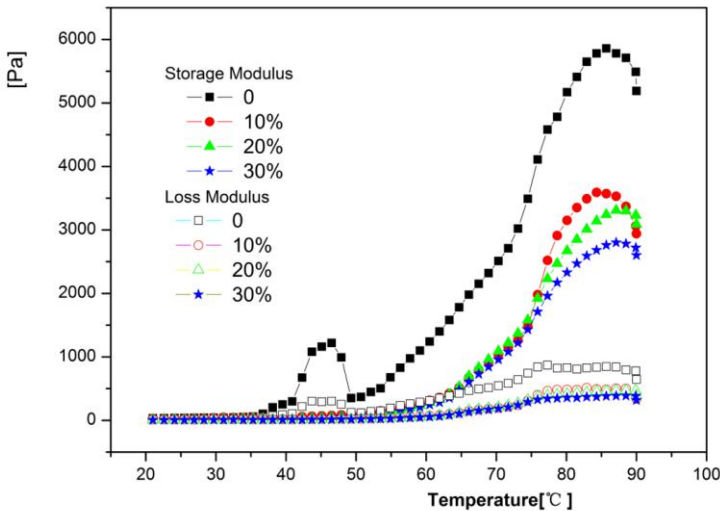


图 4- 5 不同油脂添加量下，加热温度对流变模量的影响

在鹅肝酱中分别添加 0%、10%、20%、30%的橄榄油对其进行温度扫描。由图 4-5 可知，各处理组的 G' 值和 G'' 值均小于对照组，随着橄榄油添加量的增加曲线的总体趋势未改变，但 G' 值和 G'' 值在减小。对照组 G' 值显著大于处理组，说明处理组的弹性小于对照组，这可能是因为橄榄油的加入，使体系中的组分稀释，同时表现出良好的乳化效果。在所以处理组中，产品的 G' 值始终大于 G'' 值， G' 和 G'' 值没有交叉点，表现出弱凝胶的特征。

相对于对照组而言，各处理组未出现第二个峰值，而对照组在 45°C时出现了一个小峰，这可能是因为处理组因为有油脂的加入，形成致密的稳定体系，保护酱体不受糊化温度的影响。

4.1.5.2.2 质构结果分析

表 4-4 不同橄榄油添加量下肝酱的质构分析

处理	硬度(N)	弹性 (mm)	内聚性(-)	黏性(N)	咀嚼性 (J/1000)
0%	30.690±0.395 ^a	0.663±0.019 ^a	0.639±0.011 ^a	0.413±0.033 ^a	20.166±0.628 ^a
10%	22.763±0.405 ^b	0.689±0.006 ^a	0.623±0.061 ^a	0.466±0.024 ^a	18.131±0.381 ^a
20%	11.445±0.726 ^c	0.683±0.009 ^a	0.603±0.019 ^b	0.526±0.042 ^b	11.720±0.456 ^b
30%	0.258±0.814 ^d	0.393±0.017 ^b	0.585±0.023 ^b	0.284±0.342 ^c	0.088±0.693 ^c

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

由上表 4-4 结果可知，随着橄榄油添加量的增大，不同处理组的弹性、黏性，咀嚼性均减小，且各处理组之间有显著性差异。鹅肝酱主要作为涂抹用酱，决定其涂抹性的重要质构指标为硬度和黏性。随着油的添加，鹅肝酱硬度和粘性指数的绝对值不断减小，酱体不够坚实较易流动。植物油添加量为 20%时，酱体即能流动，又不会造成塌陷。

4.1.5.2.3 感官评定结果分析

表 4-5 不同橄榄油添加量肝酱的感官评定结果

处理	色泽	风味	形态	口感	总体可接受性
0%	6.71±0.198 ^b	7.907±0.207 ^c	6.04±0.374 ^b	7.00±0.378 ^b	6.05±0.316 ^b
10%	8.72±0.389 ^a	8.43±0.281 ^{bc}	8.69±0.678 ^a	8.83±0.352 ^a	8.83±0.431 ^a
20%	8.75±0.342 ^a	8.67±0.493 ^{abc}	8.65±0.591 ^a	9.08±0.826 ^a	8.93±0.672 ^a
30%	8.70±0.663 ^a	8.87±0.289 ^a	5.12±0.528 ^c	8.76±0.368 ^a	8.78±0.620 ^a

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

根据感官评定的结果可知，鹅肝酱对照组的各项指标均低于处理组，不添加橄榄油的酱体风味较差，略有肝腥味，油添加量少时酱体的风味也不高，然而添加过多的油脂时，虽然油脂的风味较好，但是酱体有部分油析出，影响酱体的形态。

由表 4-5 评定的结果得出，选择 20%的橄榄油添加量不仅有较好的感官评价结果，而且可在一定程度上降低成本。

4.1.5.3 冰水对鹅肝酱流变、质构和感官性质的影响

4.1.5.3.1 流变性质

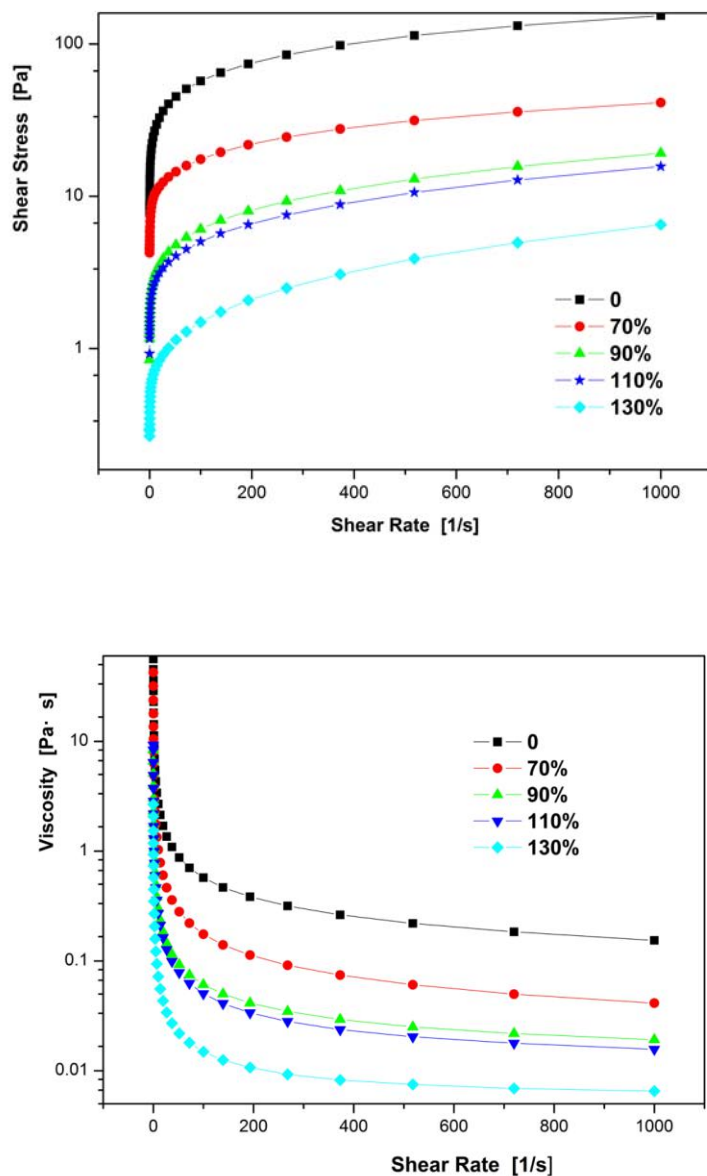


图 4-6 不同冰水添加量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响

不同冰水含量的鹅肝酱剪切速率与剪切应力和粘度关系如图 4-6 所示，在相同的剪切速率下，随着添加量的增加，剪切应力值不断减小，粘度也表现出下降趋势。这可能是因为冰水的加入使体系之间分子作用力减小，使体系稳定性下降。随着剪切速率的增大剪切应力和粘度值趋于稳定，可能由于高剪切下，分子间作用力被破坏，体系变为流体状态，剪切应力和粘度值趋于定值。90%和 110%冰水添加量的曲线基本重合，说明添加 90%和 110%冰水对产品的影响基本一致，两个曲线值得出的结果一致。

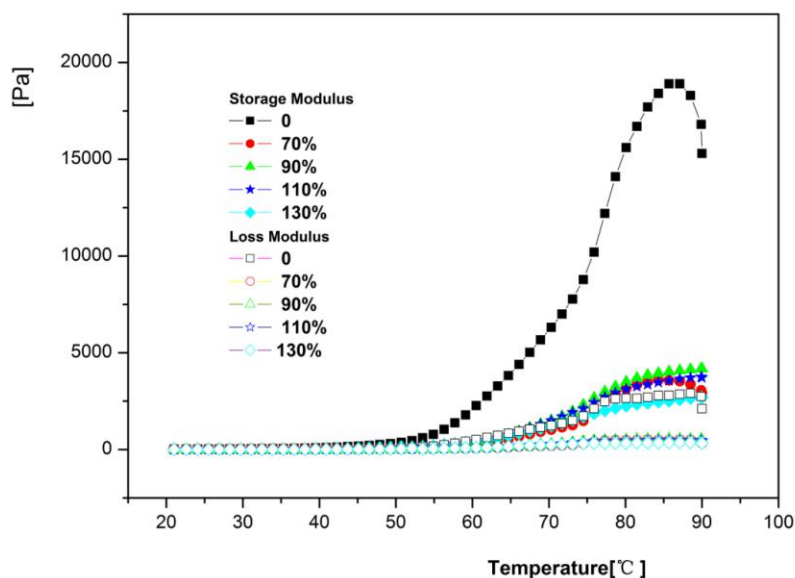


图 4-7 不同冰水添加量下，加热温度对流变模量的影响

在鹅肝酱中分别添加 0%、70%、90%、110%、130%的冰水并对其进行温度扫描，根据扫描得出的储能模量 G' 和损耗模量 G'' 值来评价酱体的总体特性。由图 4-7 可知，加热初始阶段鹅肝酱 G' 值和 G'' 值基本不变，加热一段时间体系在 55℃ 附近，其 G' 值和 G'' 值显著升高，达到最大峰值后曲线开始下降。随着水分含量的增加，体系中的蛋白质之间的键可以松弛和重组。在所以处理组中，产品的 G' 值始终大于 G'' 值， G' 和 G'' 值没有交叉点，表现出弱凝胶的特征。

鹅肝酱在经较高温度的时，其内部组织结构的变化能在一定程度上反映产品的稳定性，同时也为其在生产运输过程中对温度的耐受能力提供一些参考价值。

4.1.5.3.2 质构结果分析

表 4-6 不同冰水添加量的质构分析

处理	硬度(N)	弹性 (mm)	内聚性(-)	黏性(N)	咀嚼性 (J/1000)
0%	64.524±0.652 ^a	0.694±0.007 ^a	0.617±0.304 ^a	32.336±0.304 ^a	0.645±0.013 ^a
70%	40.210±0.925 ^b	0.688±0.009 ^{ab}	0.539±0.031 ^b	18.703±0.269 ^b	0.615±0.060 ^b
90%	15.669±0.037 ^c	0.681±0.014 ^{ab}	0.480±0.011 ^c	7.540±0.179 ^c	0.662±0.019 ^c
110%	7.334±0.777 ^c	0.674±0.010 ^{bc}	0.478±0.029 ^c	2.655±0.246 ^c	0.576±0.020 ^c
130%	0.965±0.283 ^d	0.660±0.013 ^c	0.348±0.013 ^d	0.042±0.480 ^d	0.491±0.032 ^d

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

由表 4-6 结果可知，随着冰水添加量的增加产品的硬度、弹性、内聚性、黏性以及咀嚼性均减小，这是由于水的添加使分子间的距离增大，减小了它们之间的吸引力，使得各项指标均减小。其中 90%和 110%添加量的硬度、内聚性、黏性及咀嚼性无显著性差异，这与流变性质的结果一致，结合其他评价指标以确定冰水最佳添加量。

4.1.5.3 感官评定结果分析

表 4-7 不同冰水添加量的感官评定结果

处理	色泽	风味	形态	口感	总体可接受性
0%	7.71±0.521 ^b	8.367±0.862 ^c	7.00±0.790 ^b	7.00±0.621 ^b	6.47±0.357 ^b
70%	8.83±0.232 ^a	8.53±0.751 ^{bc}	8.80±0.425 ^a	8.83±0.288 ^a	8.69±0.658 ^a
90%	8.86±0.741 ^a	8.77±0.167 ^{abc}	8.83±0.561 ^a	8.80±0.241 ^a	8.72±0.433 ^a
110%	8.90±0.316 ^a	8.97±0.325 ^a	8.89±0.189 ^a	9.13±0.319 ^a	9.03±0.442 ^a
130%	8.7±0.416 ^a	8.90±0.395 ^a	8.77±0.953 ^a	8.77±0.451 ^a	8.77±0.241 ^a

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

由感官评定结果表 4-7 可知，不添加冰水时，酱体的色泽、风味、形态、口感等评分较低，总体可接受水平最低，这可能由于不添加冰水时，酱体呈固态，不能流动，且色泽较差，总体接受度不高。随着冰水添加量的增加，各项指标均有所提高，这可能由于水的加入使酱体表现出流动性，可涂抹性有所提高，当添加量达到 110%时各项指标均达到最优，更受评价者的青睐。达到 130%时，不成酱体，不能被涂抹。所以冰水的添加量在 110%时能得到最佳的产品。

4.1.5.4 涂抹型产品正交实验

表 4-8 切片型产品正交实验表

水平	(A) 橄榄油 (%)	(B) 玉米淀粉 (%)	(C) 冰水 (%)
1	15	6	90
2	20	8	110
3	25	10	130

表 4-9 切片型产品感官评定正交实验表

试验序号	因素			感官评定结果
	A	B	C	
1	1	1	1	8.8
2	1	2	2	8.5
3	1	3	3	6.5
4	2	1	2	8.3
5	2	2	3	9.5
6	2	3	1	7.8
7	3	1	3	7.5
8	3	2	1	7.1
9	3	3	2	7.7
k1	7.933	8.200	7.900	--
k2	8.533	8.367	8.167	--
k3	7.433	7.333	7.833	--
R	1.100	1.034	0.334	--

根据表 4-8 鹅肝酱产品感官评定正交试验结果得出的最优组合是 $A_2B_2C_3$ ，即为橄榄油添加量 20%、玉米淀粉添加量 8%、冰水添加量 130%时感官评定结果得分最高。

根据单因素实验和极差结果分析得出的最优组合是 $A_2B_2C_2$ ，即为橄榄油添加量 20%、玉米淀粉添加量 8%、鹅肝添加量 110%时感官评定结果得分最高。根据极差可得出对鹅肝酱感官评定的主要影响因素顺序为橄榄油>玉米淀粉>冰水。

4.1.5.4 涂抹型产品验证试验

根据对鹅肝酱产品进行感官评定正交实验分析得出的结果看出，有两个组合得分较高。因此我们对这两个组合进行验证试验进一步得出最优配方。

表 4-10 切片型产品最优配方对照表

项目	感官评定	分数
$A_2B_2C_3$	酱体质地均匀，口感细腻，有鹅肝特有的香味，涂抹性稍差	9.85
$A_2B_2C_2$	酱体质地均匀，口感细腻，有鹅肝特有的香味，涂抹性好	9.50

上述结果表 4-11 可看出，当鹅肝酱产品橄榄油添加量 20%、玉米淀粉添加量 8%、冰水添加量 110%时酱体质地均匀，口感细腻，有鹅肝特有的香味，涂抹性好，感官评定结果得分最高。因此我们选取此组合研制出备受人们青睐的新型鹅肝酱，由此加以利用生产量巨大的鹅肝副产品，增加养殖户的收入，实现双赢。

4.1.5.5 涂抹型产品营养成分的测定

4.1.5.5.1 测定方法

同原料鹅肝理化与营养品质的测定方法相同

4.1.5.5.2 测定结果

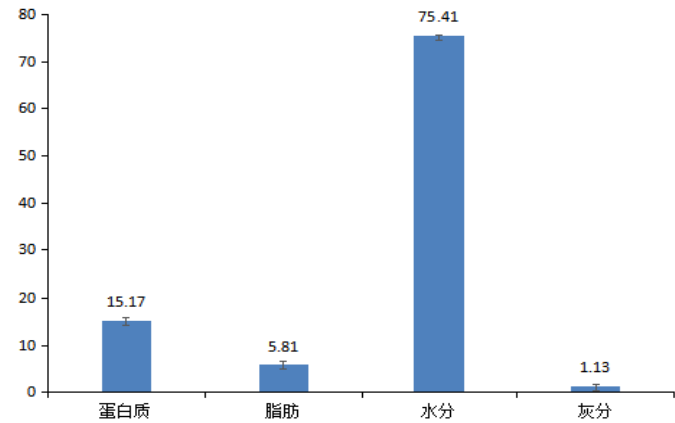


图 4-8 涂抹型鹅肝酱产品主要营养成分

由测定结果图 4-8 可知，100g 的鹅肝酱中含有 15.17g 的蛋白质，5.81g 的脂肪，75.40g 的水。总体上来说，可以作为充足的膳食蛋白质以及脂肪补充来源。

4.2 切片型鹅肝产品的研制

4.2.1 工艺流程

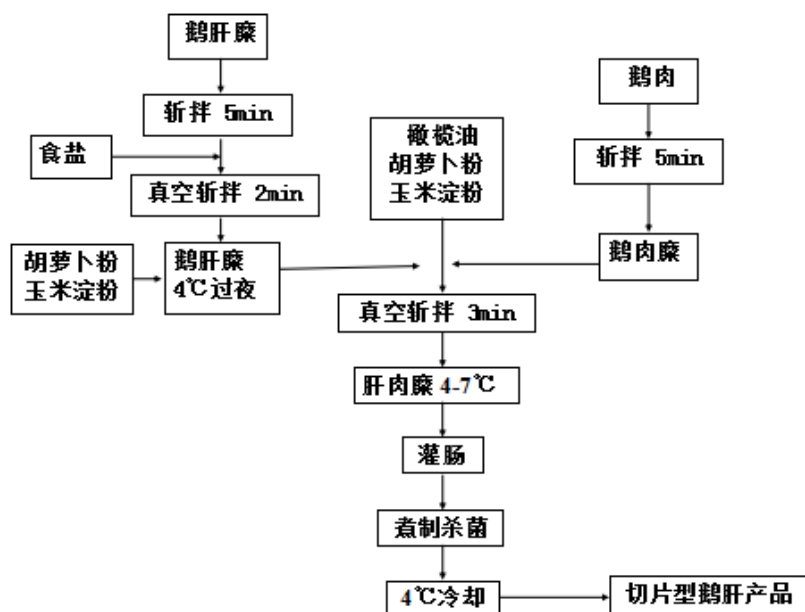


图 4-9 切片型鹅肝酱产品的生产工艺流程

4.2.2 操作要点

原料验收：对采购的原料进行验收，选择经卫生检验合格的新鲜鹅肝，剔除颜色、气味不正常，有变质现象的鹅肝。

原料整理：鹅肝及鹅肉在流动水中清洗，摘去血管、剔除骨头、筋腱和结缔组织。

鹅肝糜制备：将肝糊高速斩拌 5 min，控制肝糜温度在 4-7 ℃，加入胡萝卜粉，玉米淀粉放置 4℃冷藏过夜。

斩拌：将前处理好的鹅肉低速斩拌 5min，再将过夜冷藏的鹅肝放入斩拌机一起斩拌 2min，将冰水和橄榄油放入斩拌机中低速斩拌 3min。

灌肠：用塑料肠衣每 7cm 扎一个结，每节 150g。

煮制杀菌：蒸煮锅 80℃煮 20min，至室温后放置 4℃冷藏。

4.2.3 实验设计

4.2.3.1 玉米淀粉对切片型产品的影响

鹅肝切片型产品的加工工艺如上所示。以 20%的橄榄油，40%的鹅肝为工艺参数，固定其他工艺参数，按玉米淀粉为 0、4%、6%、8%、10%的添加量（玉米淀粉所占比例为鹅肝、鹅肉、橄榄油、水重量之和的比例）对产品进行分析。

4.2.3.2 橄榄油对切片型产品的影响

鹅肝切片型产品的加工工艺不变。以 40%的鹅肝，6%的玉米淀粉为工艺参数，固定其他工艺参数，按橄榄油为 0、10%、15%、20%、25%的添加量对产品进行分析。

4.2.3.3 鹅肝添加量对切片型产品的影响

固定其他工艺参数，按鹅肝添加量为 0、20%、25%、40%、50%、60%、75%、100%对产品进行分析。

4.2.4 检测方法

4.2.4.1 流变学分析

同前述流变学分析方法

4.2.4.2 质构测定

将煮制好的肠 4℃放置 24h，用双面刀切成 10 mm 高的圆柱体进行质构测定。用 TA—XT2i 型质构仪测在 20℃的条件下测定各配方的香肠的质构特性。选用 TPA 模式；夹具选择：P50 探头；测试前速度：2.0 mm/s；测试速度：5.0 mm/s，测试后速度：5.0 mm/s；形变量：25%；负载力：5 g；每个样品重复 5 次。测定结果选取硬度、弹性、咀嚼性 3 个指标。

4.2.4.3 保水性（WHC）测定

参照 Perezmateos 的方法稍加改动。用双面刀将煮制好 4℃放置 24 h 的香肠切成 1 cm 的正方体，称取质量记为 m1（精确到 0.001g），放置于离心管中 20℃、3000g 离心 15min。取出离心后的香肠用吸水纸将表面水分吸干，再次称取重量记为 m2。每个处理重复 5 次。保水性的计算公式为：

$$\text{WHC} (\%) = (1 - m2/m1) \times 100$$

4.2.4.4 感官评定

表 4- 11 鹅肝切片型产品感官评价表

指标	感官评价	分数（分）	打分
色泽	色泽均匀，外表有光泽	7-10	
	色泽略不均匀，外表稍有光泽	5-7	
	色泽不均匀，外表无光泽	1-4	
香气	肠香味纯正，无肝腥味	7-10	
	肠香味稍差，略有肝腥味	5-7	
	肠香味差，肝腥味严重	1-4	
形态	切面光滑，切面无明显气泡	7-10	
	切面略光滑，切面略有气泡	5-7	
	切面不光滑，切面有明显气泡	1-4	
口感	口感细腻，咀嚼时无颗粒感	7-10	
	口感稍粗糙，稍有颗粒感	5-7	
	口感很粗糙，颗粒感较重	1-4	

4.2.5 切片型肝酱实验结果分析

4.2.5.1 玉米淀粉对切片型产品影响的结果分析

4.2.5.1.1 流变性质

由静态剪切流变结果图 4-10 可知，鹅肝酱中分别添加 0%、4%、6%、8%、10%的玉米淀粉，得出剪切速率-剪切应力的曲线，不同玉米淀粉添加量的鹅肝酱剪切速率和剪切应力呈非线性关系。随着剪切速率的增加，鹅肝酱中的颗粒成分间距减小，作用力加大，形成的凝胶网络结构更加紧密，更不容易被破坏，所以随着剪切速率的增加，剪切应力也逐渐增加。而在同一剪切速率下，随着玉米淀粉添加量的增加，剪切应力也随之增加，这是由于玉米淀粉加入鹅肝酱体系中增加了分子间的作用力，从而使体系更加稳定。

鹅肝酱的粘度随着剪切速率的增加而减小如图 4-10 所示，呈现出假塑性流体性质，由图可看出鹅肝酱的粘度随着玉米淀粉的增加而增加，而在高速剪切条件下粘度趋向于一定值，这是因为在高转速剪切作用下，酱体剪切变稀，分子间的作用力被破坏，变为流体状态，粘度值基本不变。

在产品中分别添加 0%、4%、6%、8%、10%的玉米淀粉并对其进行温度扫描，根据扫描得出的储能模量 G' 和损耗模量 G'' 值来评价酱体的总体特性。由图 4-11 可知，加热初始阶段鹅肝酱 G' 值和 G'' 值基本不变，加热一段时间体系达到一定温度后，鹅肝酱体系的 G' 值和 G'' 值显著升高，达到最大峰值后曲线开始下降。

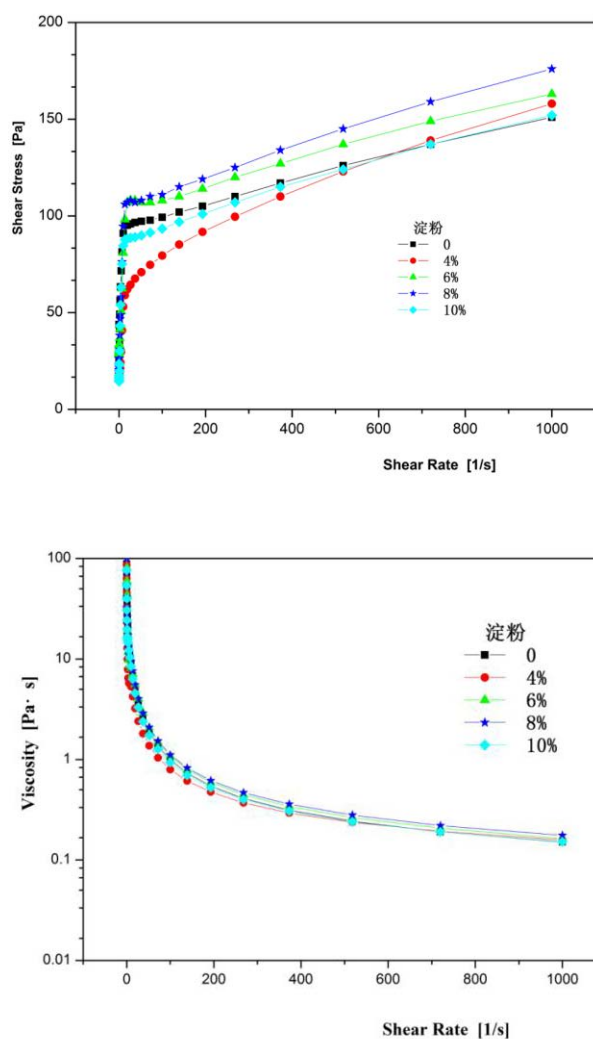


图 4-10 不同淀粉添加量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响

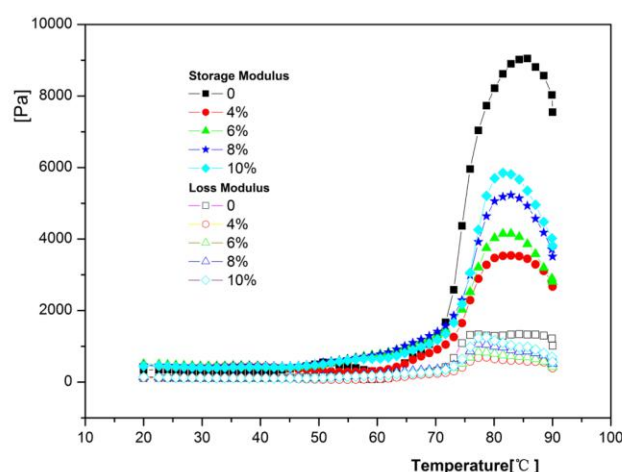


图 4-11 不同淀粉添加量下，加热温度对流变模量的影响

所有处理组的 G' 值和 G'' 值在 55 °C 附近均呈现上升趋势，这可能是由于随着温度的升高产品中颗粒逐渐吸水膨胀，当体系达到糊化温度时，颗粒大量吸水，导致体系膨胀， G' 值和 G'' 值达到最高峰时，鹅肝酱颗粒被紧密包裹在淀粉形成的凝胶网络体系中，因此酱体的弹性和粘性不断增大。温度继续升高，颗粒间的碰撞加剧，使得凝胶网络结构的部分氢键断裂开，从而使 G' 值和 G'' 值变小。

4.2.5.1.2 质构性质

表 4-12 玉米淀粉添加量的质构分析

处理	硬度(N)	弹性 (mm)	咀嚼性 (J/1000)
0%	117.893±0.512 ^e	0.258±0.022 ^c	24.307±0.362 ^a
4%	304.184±0.651 ^d	0.378±0.020 ^a	75.098±0.607 ^b
6%	477.260±0.698 ^c	0.335±0.029 ^b	128.805±0.871 ^c
8%	1150.050±0.159 ^b	0.403±0.016 ^a	373.070±0.923 ^d
10%	1349.252±0.416 ^a	0.402±0.010 ^a	477.912±0.299 ^e

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

由表 4-13 可得出，随着玉米淀粉添加量的增加硬度值和咀嚼性增大，这是因为玉米淀粉起到增稠剂的作用，使肠体结构更加紧密，香肠更加坚实，从而有良好的质构特性。然而加入过多的玉米淀粉会使硬度、咀嚼性增加，吞咽起来比较困难，因此我们选择 6% 的玉米淀粉添加量。

4.2.5.1.3 感官评定结果

表 4- 13 玉米淀粉添加量的感官评定分析结果

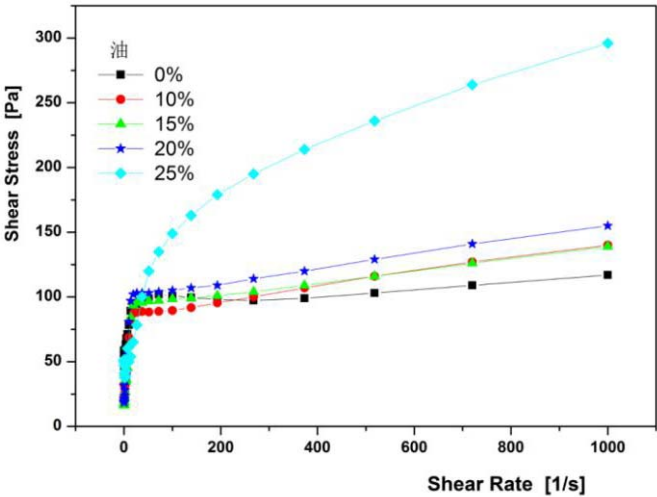
处理	评价结果	整体可接受性
0%	略有肝腥味，肠体无光泽，结构松散切不成片	7.47±0.306 ^b
4%	略有肝腥味，肠体略无光泽，结构稍松散，切面有气泡	8.93±0.321 ^a
6%	肠香味浓郁，肠体有光泽，结构紧密，切面光滑	9.03±0.503 ^a
8%	肠香味浓郁，肠体有光泽，有颗粒感，切面无气泡	8.80±0.400 ^a
10%	肠香味浓，肠体无光泽，有颗粒感，切面无气泡	8.77±0.611 ^a

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

由感官评定结果表 4-14 可知，6%的玉米淀粉添加量整体可接受性最高。玉米淀粉在香肠中充当增稠剂的作用，添加量少时，香肠结构松散切不成片状。添加量过多时，结构太过紧密，质地坚实，较难咀嚼，可接受度不高，因此我们选择 6%的玉米淀粉添加量，这与质构分析所得结果一致。

4.2.5.3 橄榄油对切片型产品影响的结果分析

4.2.5.3.1 流变性质



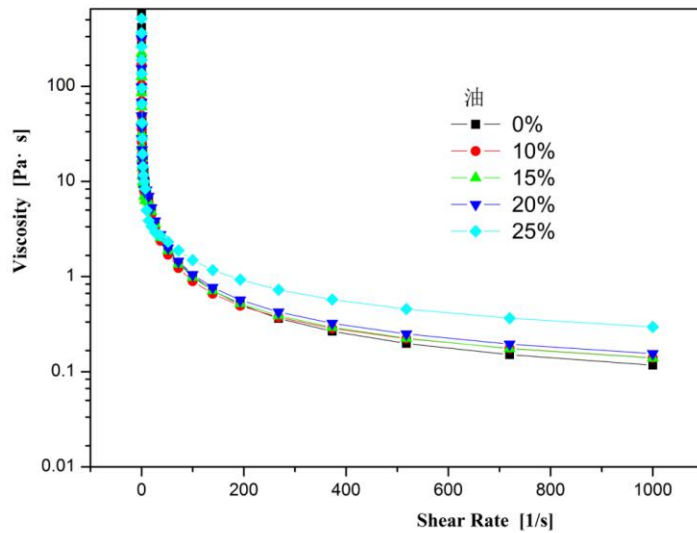


图 4-12 不同油脂添加量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响

不同油脂添加量的鹅肝酱剪切速率与剪切应力和粘度关系如图 4-12 所示，剪切速率和剪切应力呈非线性关系。随着剪切速率的增大，剪切应力不断增大，而表观粘度呈下降趋势。随着橄榄油的增加，剪切应力不断增加，这可能时因为油脂的添加使得体系变得更加稳定，同一剪切速率下的剪切应力变大。10%和15%的油脂添加量剪切速率-剪切应力曲线基本重合，25%的橄榄油添加量剪切应力值显著大于其他各组。

剪切速率和粘度也呈非线性关系。在同一剪切速率下，随着油脂含量的上升粘度值下降，表现为剪切变稀。这可能是因为受剪切速率变大的影响，水分和油滴颗粒分离，使得分子间相互作用力减小，流动阻力减弱。各处理组的粘度值均比对照组大，这与剪切速率-剪切应力曲线得出的结果一致。

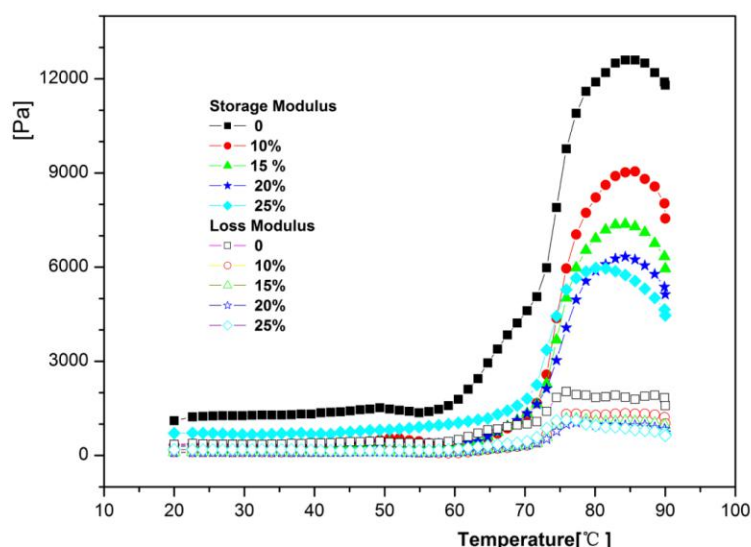


图 4-13 不同油脂添加量下，加热温度对流变模量的影响

在鹅肝酱中分别添加 0%、10%、15%、20%、25% 的橄榄油对其进行温度扫描。由图 4-13 可知，各处理组的 G' 值和 G'' 值均小于对照组，随着橄榄油添加量的增加曲线的总体趋势未改变，但 G' 值和 G'' 值在减小。这可能是因为处理组有油脂的加入，形成致密的稳定体系，保护酱体不受糊化温度的影响。加热初始阶段产品 G' 值和 G'' 值基本不变，加热一段时间体系在 60 °C 附近，其 G' 值和 G'' 值显著升高，达到最大峰值后曲线开始下降。所有处理组的 G' 值和 G'' 值均显著低于对照组。

4.2.5.3.2 质构结果分析

表 4-14 不同橄榄油添加量的质构分析结果

处理	硬度(N)	弹性 (mm)	咀嚼性 (J/1000)
0%	1115.534±0.029 ^a	0.827±0.053 ^a	568.393±0.159 ^a
10%	252.610±0.473 ^b	0.638±0.023 ^b	85.260±0.074 ^b
15%	199.682±0.897 ^c	0.626±0.044 ^b	67.096±0.876 ^c
20%	165.695±0.491 ^d	0.600±0.049 ^b	45.503±0.054 ^d
25%	102.554±0.690 ^e	0.640±0.041 ^b	35.502±0.075 ^e

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

由表 4-15 可得出，随着橄榄油添加量的增加硬度值和咀嚼性下降，这是因为橄榄油起到乳化作用，使香肠更加柔软，同时分子间的间隙增大，从而使硬度

值和咀嚼性下降。添加量在 20%时，产品的富有的硬度值使结构不易被损坏，更易切成片状，根据产品的性质我们认为植物油添加量达到 20%时最佳。

4.2.5.3 感官评定结果分析

表 4- 15 不同橄榄油添加量的感官评定结果

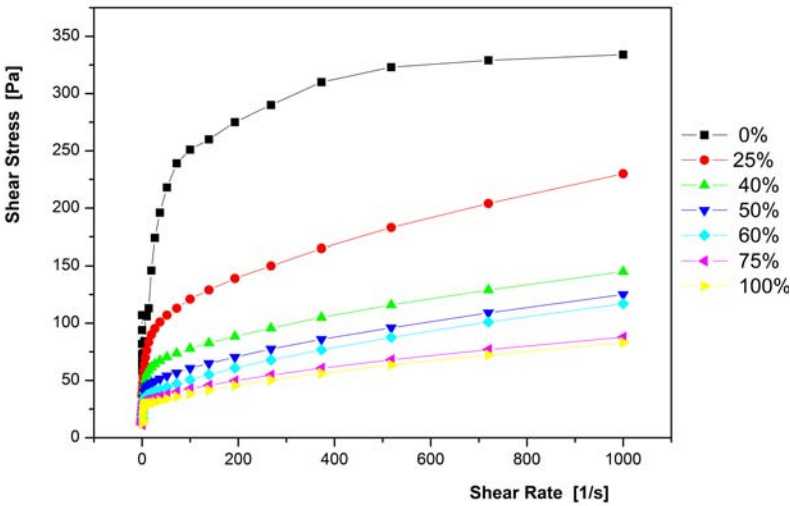
处理	评价结果	整体可接受性
0%	略有肝腥味，外表无光泽，有颗粒感存在	7.00±0.361 ^b
10%	略有肝腥味，有颗粒感存在	7.10±0.298 ^b
15%	肠香味稍差，外表稍有光泽口感细腻	8.80±0.361 ^{ab}
20%	肠香味浓郁，外表有光泽，口感细腻，切面无气泡	9.53±0.208 ^a
25%	肠香味被油脂的味道掩盖，部分油析出，切面无气泡	8.77±0.3321 ^{ab}

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

由感官评定结果表 4-16 可知，20%的橄榄油添加量整体可接受性最高。橄榄油添加量少时，煮制出的香肠略有腥味，添加量达到 20%时即能散发出浓郁的肠香味，又能补充人体所需的不饱和脂肪酸。这与质构得出的结果相同。

4.2.5.4 鹅肝添加量对切片型产品影响的结果分析

4.2.5.4.1 流变性质



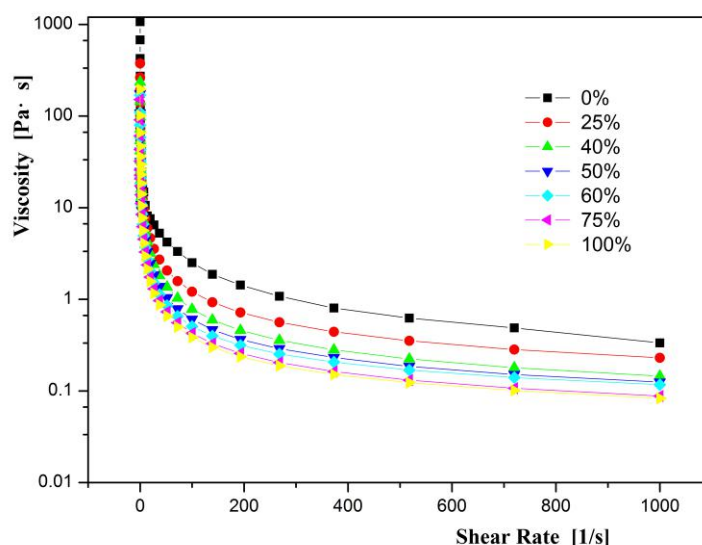


图 4-14 不同鹅肝用量下，剪切速率对剪切应力和粘度的影响

不同鹅肝添加量的产品剪切速率与剪切应力和粘度关系如图 4-14 所示，剪切速率和剪切应力呈非线性关系。随着剪切速率的增大，剪切应力不断增大，而粘度呈下降趋势。在同一剪切速率下，全是鹅肉的产品剪切应力值最大，随着鹅肝比例的增加，剪切应力不断减小，这可能是因为鹅肝蛋白质网络结构比鹅肉的网络结构稍松散所导致的。75%和 100%的鹅肝添加量剪切速率-剪切应力曲线基本重合。

剪切速率和粘度也呈非线性关系。在同一剪切速率下，随着鹅肝比例的上升粘度值下降，表现为剪切变稀。这可能是因为受剪切速率变大的影响，分子间相互作用力减小，流动阻力减弱。各处理组的粘度值均比对照组小，这与剪切速率-剪切应力曲线得出的结果一致。

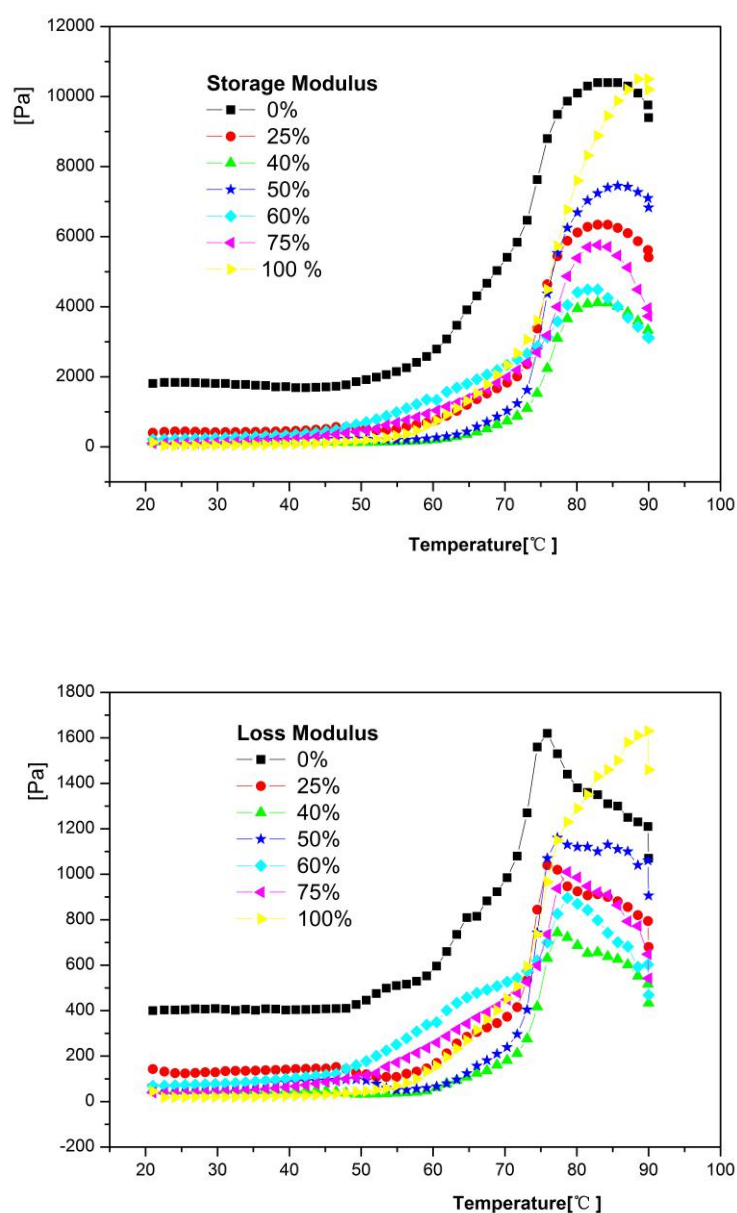


图 4-15 不同鹅肝用量下，加热温度对流变模量的影响

在切片型产品中分别添加 0%、25%、40%、50%、60%、75%、100%的鹅肝（所占百分比为鹅肝和鹅肉质量之和）并对其进行温度扫描，根据扫描得出的储能模量 G' 和损耗模量 G'' 值来评价酱体的总体特性。由图 4-15 可知，加热初始阶段产品 G' 值和 G'' 值基本不变，加热一段时间体系达到一定温度后，体系的 G' 值和 G'' 值显著升高，达到最大峰值后曲线开始下降。

所有处理组的 G' 值和 G'' 值在 55 °C 附近均呈现上升趋势， G' 值和 G'' 值达到最高峰时，产品颗粒被紧密包裹在蛋白质形成的凝胶网络体系中，因此弹性和粘性不断增大。温度继续升高，颗粒间的碰撞加剧，使得凝胶网络结构的部分氢键

断裂开，从而使 G'值和 G''值变小。G'值在 55℃之后明显高于 G''值，这说明产品为弹性占优势的粘弹性体系，而鹅肝的添加并未改变产品的这个性质。

4.2.5.4.2 质构结果分析

表 4- 16 不同鹅肝添加量的质构分析结果

处理	硬度(N)	弹 性 (mm)	咀嚼性 (J/1000)
0%	551.770±2.745 ^d	0.860±0.030 ^{ab}	332.609±0.944 ^d
25%	519.956±1.891 ^e	0.864±0.025 ^{ab}	298.499±2.069 ^f
40%	422.124±1.398 ^f	0.842±0.006 ^b	243.476±0.339 ^g
50%	545.306±1.637 ^d	0.848±0.018 ^b	311.609±0.315 ^e
60%	642.876±0.164 ^c	0.871±0.024 ^{ab}	381.071±1.755 ^c
75%	695.637±2.783 ^b	0.889±0.019 ^a	421.076±1.393 ^b
100%	786.368±0.955 ^a	0.885±0.012 ^a	496.751±0.290 ^a

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

由表 4-17 可知鹅肝添加量的增加硬度值和咀嚼性先减小后增加，弹性值无显著性差异。这可能是由于香肠以鹅肉为主体时，由于盐的加入使蛋白质析出，从而使度值和咀嚼性下降。当鹅肝的添加量达到 50%时，两种原料的蛋白质分子互补了分子间隙，使香肠的结构更加紧密，从而使硬度值和咀嚼性增大。当鹅肝的添加量达到一定比例时，鹅肉的蛋白质分子作用减小。

鹅肝添加量在 40%时硬度值和咀嚼性值最小，适合婴幼儿的咀嚼性要求。

4.2.5.4.3 感官评定结果分析

表 4- 17 不同鹅肝添加量的感官评定结果

处理	评价结果	整体可接受性
0%	肠香味差，外表无光泽，口感粗糙，切面有气泡	6.58±0.19 ^d
25%	肠香味稍差，外表无光泽，口感略粗糙，切面有气泡	7.2±0.16 ^c
40%	肠香味浓郁，外表稍有光泽，口感细腻	9.06±0.40 ^a
50%	无肝腥味，外表有光泽，有颗粒感存在，切面略有气泡	7.64±0.24 ^b
60%	略有肝腥味，切面略有气泡	7.38±0.29 ^{bc}
75%	肝腥味较重，外表无光泽，稍有颗粒感存在，切面无气泡	6.18±0.19 ^e
100%	肝腥味重，外表无光泽，有颗粒感存在，切面无气泡	5.62±0.36 ^f

注：同列数值之间上标字母不相同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

由感官评定结果表 4-18 可知，鹅肝添加量过少，过多的感官评定结果均不好。添加量过少产品的气泡较多，可能是因为鹅肉的组织结构较大，灌肠时以产生气泡，导致切面有气泡。添加量过多时产品有较重的肝腥味，因为肝的颜色呈深棕色，使香肠外表无光泽，评价分数相对较低。而当鹅肝的添加量达到 40% 时，有肠香味浓郁，外表有光泽，切面光滑，能引起人的食欲，有较高的得分，且显著高于其他处理组。综合流变，质构，感官评定的结果可知，当鹅肝的添加量达到 40% 时能使产品有较好的品质。

4.2.5.5 正交实验

表 4- 18 切片型产品正交实验表

水平	(A) 橄榄油 (%)	(B) 玉米淀粉 (%)	(C) 鹅肝量 (%)
1	15	4	25
2	20	6	40
3	25	8	50

表 4- 19 切片型产品感官评定正交实验表

试验序号	因素			感官评定结果
	A	B	C	
1	1	1	1	5
2	1	2	2	6
3	1	3	3	8.5
4	2	1	2	9
5	2	2	3	9.5
6	2	3	1	6
7	3	1	3	8.5
8	3	2	1	8
9	3	3	2	8
k1	6.500	7.500	7.500	--
k2	8.167	7.667	6.833	--
k3	8.167	8.833	8.500	--
R	1.667	2.500	1.667	--

根据表 4-19 和表 4-20 的切片型产品感官评定正交试验结果得出的最优组合是 $A_2B_2C_3$ ，即为橄榄油添加量 20%、玉米淀粉添加量 6%、鹅肝添加量 50% 时感官评定结果得分最高。

根据单因素实验和极差结果分析得出的最优组合是 $A_2B_3C_3$ ，即为橄榄油添加量 20%、玉米淀粉添加量 8%、鹅肝添加量 50%时感官评定结果得分最高。根据极差可得出对鹅肝切片型产品感官评定的主要影响因素为玉米淀粉。

4.2.5.6 验证试验

根据对切片型产品进行感官评定正交实验分析得出的结果看出，有两个组合得分较高。因此我们对这两个组合进行验证试验进一步得出最优配方，见表 4-21。

表 4- 20 切片型鹅肝酱产品最优配方

项目	感官评定	分数
$A_2B_2C_3$	肠香味浓郁，外表有光泽，切面光滑无气泡	9.85
$A_2B_3C_3$	肠香味浓郁，外表有光泽，切面光滑，稍有气泡	9.50

上述结果表 4-21 可看出，当鹅肝切片型产品橄榄油添加量 20%、玉米淀粉添加量 6%、鹅肝添加量 50%时切面光滑无气泡，感官评定结果得分最高。因此我们选取此组合研制出备受人们青睐的新型鹅肝香肠制品，由此加以利用生产量巨大的鹅肝副产品，增加养殖户的收入，实现双赢。

4.2.5.6 产品营养成分的测定

4.2.5.6.1 测定方法

同原料鹅肝理化与营养品质的测定方法相同。

4.2.5.6.2 测定结果

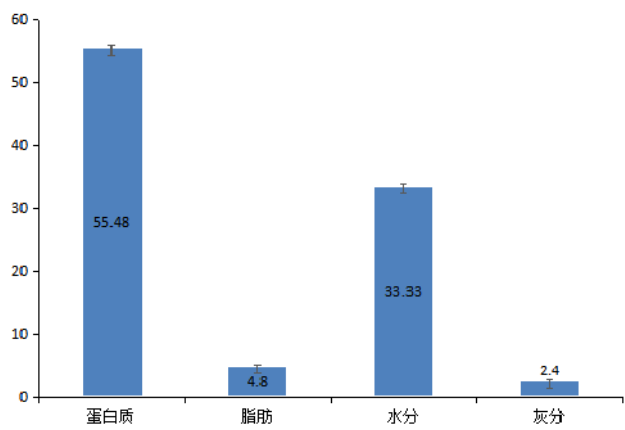


图 4- 16 切片型鹅肝酱产品主要营养成分

表 4- 21 切片型鹅肝酱产品颜色及保水性指标

项目	产品
L*	54.06±1.00
a*	13.37±0.49
b*	15.73±0.47
保水性 (%)	97.92±0.73

由测定结果图 4-16 和表 4-22 可知，切片型产品因为有鹅肉的加入，蛋白质含量高达 55.48g/100g，能提供人体所需的蛋白质，加入富含丰富的不饱和脂肪酸的橄榄油能提供人体所需的必须脂肪酸，产品的保水性较好，保水率高达 97.92%，因鹅肉的加入产品具有良好的光泽，亮度值为 54.06，红度值为 13.37，黄度值为 15.73，总体颜色较好，能够引起人的食欲。

结 论

- 1、鹅肝中蛋白质含量达到 21.17%，可作为膳食补充蛋白质的来源。鹅肝蛋白质的氨基酸组成中，除可能因为检测中被酸水解破坏掉的色氨酸，其它必须氨基酸含量均衡。
- 2、按照原料鹅肝蛋白质的提取效率进行提取条件的筛选，优选条件为：在高 pH（12.0）下进行溶解，在等电点 5.5 下进行回收，可达到最大的提取效率。
- 3、蛋白浓度、植物油用量都会显著影响鹅肝蛋白的乳化性能。高 pH 溶解，等电点回收的方法会引起蛋白质溶解度以及乳化性能下降，但可以通过磷酸化处理提升蛋白质的溶解度及乳化性。
- 4、对鹅肝蛋白进行了质谱测定和分子模拟，热诱导凝胶相图研究表明：pH 和加热温度对凝胶性质的影响大于离子强度及蛋白浓度。选取原料鹅肝蛋白质谱信号强度最高的前 20 个蛋白中的血红蛋白亚基和组蛋白 H3.2 进行分子模拟，发现 pH 对蛋白的二级结构以及表面电荷具有显著影响。
- 5、涂抹型鹅肝酱的最佳配方为：以鹅肝为 100%计，橄榄油添加量 20%、玉米淀粉添加量 8%、冰水添加量 110%。切片型鹅肝酱的最佳配方为：橄榄油添加量 20%、玉米淀粉添加量 6%、鹅肝添加量 50%，冰水添加量 110%。

参 考 文 献

- [1] Abdollahi, M., Rezaei, M., Jafarpour, A. & Undeland, I. (2017). Dynamic rheological, microstructural and physicochemical properties of blend fish protein recovered from kilka (*Clupeonella cultriventris*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by the pH-shift process or washing-based technology. *Food Chemistry*, 229, 695-709.
- [2] Cortes-Ruiz, J. A., Pacheco-Aguilar, R., Ramirez-Suarez, J. C., Lugo-Sanchez, M. E., Garcia-Orozco, K. D., Sotelo-Mundo, R. R. & Pena-Ramos, A. (2016). Conformational changes in proteins recovered from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle through pH shift washing treatments. *Food Chemistry*, 196, 769-775.
- [3] Egeland, B., Martinsen, B. & Aulund, K. (1995). Rheological parameters as predictors of protein functionality: a model study using myofibrils of different fibre-type composition. *Meat science*, 35, 97-111.
- [4] Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem*, 177, 751-766.
- [5] Hrynets, Y., Omana, D. A., Xu, Y. & Betti, M. (2011). Comparative study on the effect of acid-and alkaline-aided extractions on mechanically separated turkey meat (MSTM): Chemical Page 18 of 31 characteristics of recovered proteins. *Process Biochemistry*, 46, 335-343.
- [6] Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K. & Bawa, A. (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of food science and technology*, 49, 278-293.

附 录

本项目执行期间授权的相关专利及发表的相关文章：

(1) 授权的专利

国家发明专利“富含不饱和脂肪酸的涂抹型禽肝酱及其制作方法(ZL 201410179631.4)”

国家发明专利“一种可食用禽肝脏蛋白的提取方法(ZL 201410179630.x)”

国家发明专利“低温涂抹型禽肝酱及其生产方法(ZL 201410179632.9)”

(2) 发表的论文 (均已标注项目资助)

Guoyuan Xiong, Minyi Han, Zhuangli Kang, Yingying Zhao, Xinglian Xu*, Yingying Zhu. Evaluation of protein structural changes and water mobility in chicken liver paste batters prepared with plant oil substituting pork back-fat combined with pre-emulsification. Food Chemistry, 2016, 196: 388-395.

Guoyuan Xiong, Peng Wang, Haibo Zheng, Xinglian Xu*, Yingying Zhu, Guanghong Zhou. Effects of plant oils combinations substituting pork back-fat combined with pre-emulsification on physicochemical, texture, microstructure and sensory properties of spreadable chicken liver pâté. Journal of Food Quality, 2016,4(39):331-341.

Xiong Guoyuan, Gao Xueqin, Wang Peng, Xu Xinglian*, Zhou Guanghong. Comparative study of extraction efficiency and composition of protein recovered from chicken liver by acid-alkaline treatment. Process Biochemistry, 2016,51(10):1629-1635 .

Guoyuan Xiong, Xueqin Gao, Haibo Zheng, Xinglian Xu*, Huijuan Yang, Guanghong Zhou. Comparison on the physico-chemical and nutritional quality of normal and abnormal colored fresh chicken liver. Animal Science Journal, 2016, (In press, doi: 10.1111/asj.12719).

前瞻性联合研究项目

基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白

加工特性研究

绩 效 分 析 报 告

一、概述

“基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究”项目已执行完毕，课题组对本项目的完成情况和团队成员的工作表现进行了详细的分析和客观的绩效评价。

本次绩效分析采用多角度评估法，是指通过主要技术指标完成情况、人力及经费投入产出比、近期及远期社会效益三方面进行评估分析，从而保证绩效分析结果的客观性和科学性。

二、考核结果分析

1 主要技术指标完成情况

项目的合同的技术指标为：建立高效可食用鹅肝蛋白提取工艺；阐明鹅肝蛋白加工特性形成机制；开发鹅肝新产品 1-2 种。

本项目实施后，技术指标的实际完成情况为：首次建立了基于 ISP（等电点溶解/沉淀）的鹅肝蛋白提取的技术，提取率达 79%，为从鹅肝中回收可食用蛋白提供了高效、安全的方案；综合运用流变学、光谱学和分子模拟等分析方法，揭示了鹅肝蛋白的凝胶和乳化形成机制，进一步运用定量蛋白组学技术阐明了磷酸化处理提高鹅肝蛋白乳化能力的分子机理；优化了鹅肝产品的加工工艺参数，开发了涂抹型和切片型两个鹅肝新产品。

2 主要经济指标完成情况：

项目的合同的经济指标为：生产优质鹅肝产品 10000kg，新增经济效益 60 万元，利税 12 万元。

本项目实施后，实际的直接经济效益为生产优质鹅肝产品 12000 kg，新增经济效益 109 万元，利税 37 万元。间接上，通过涂抹型和切片型鹅肝的新产品溢价效应，为相应企业提升了产品的市场竞争力及预期盈利能力。

3. 项目实施的近期及远期社会效益

1) 对三农的意义：为鹅肝这一典型的农产品加工副产物提供了新的深加工技术方案，为饲养户提供了新的增收途径，对“三农”有重要意义。

2) 对食品产业的带动效应：突破了我国对鹅肝的利用以酱卤产品为主的现状，研发了营养健康的低温涂抹型鹅肝酱和富含不饱和脂肪酸的涂抹型鹅肝酱产

品。为食品加工业的产品创新提供了新的产品形式，为以鹅肝为蛋白来源的食品打开了思路。

3) 人才培养与团队工作表现：通过项目实施，培养研究生 3 人，其中博士 1 人，为畜禽副产物利用领域输送了专业人才。团队分工明确，合作融洽。

三、自评与改进建议

1、自评：对比任务书中规定的技术及经济社会指标，各项指标都已超额完成，绩效自评良好。

2、改进建议：动物肝脏蛋白作为潜力很大的蛋白质补充物来源，需要进一步进行特定人群的食用营养效应研究，这需要本项目之外的数量较大的后续资金支持。建议相关科研管理部门持续对动物肝脏蛋白研究进行资金支持。

江苏省科技计划项目经费决算表

经费单位：万元

项目编号	BY2014128-02			
项目名称	基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究			
经费投入		经费支出		
来源	投入数	科目	支出数	其中：省拨款支出数
投入合计		支出合计	14.4114	14.4114
1、省拨款	15	(一) 直接费用		
2、部门、地方配套		1、设备费	0.5755	0.5755
3、承担单位自筹		(1) 设备购置费	0.5755	0.5755
4、其他来源		(2) 设备试制费		
		(3) 设备改造与租赁费		
		2、材料费	5.1064	5.1064
		3、测试化验加工费	1.5	1.5
		4、燃料动力费		
		5、差旅费	3.5098	3.5098
		6、会议费		
		7、国际合作与交流费		
		8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.4697	1.4697
		9、劳务费	1.5	1.5
		10、专家咨询费		
		11、其他支出		
		(二) 间接费用	0.75	0.75
		其中：绩效支出		
经费结余		0.5886		

项目负责人：

财务部门负责人：

(承担单位财务章)

(承担单位财务审计章)

2017年 8月 14日

基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白

加工特性研究

合作企业项目完成情况报告



扬州天歌鹅业发展有限公司

2017 年 5 月

一、任务来源

江苏省产学研联合创新资金-前瞻性联合研究项目，本项目主持单位为南京农业大学，我单位（扬州天歌鹅业发展有限公司）为合作企业。

二、选题背景

（一）选题依据

中国作为鹅生产的传统大国，而江苏又有全国知名的扬州鹅品种，生产鹅肝产量大，品质优，但对鹅肝的深加工则相对落后，产品形式单一（鹅肝深加工产品多为酱卤和腌制品），加工技术落后，保水保油能力差，口感风味不佳，相关肝脏加工机理研究不清等原因，造成鹅肝价值没有得到很好的体现。究其原因，主要是对鹅肝加工性能，尤其是对含量高达近20%的肝脏蛋白的加工特性了解甚少。从我企业的层面看，主要是缺少基于鹅肝蛋白功能性质的鹅肝加工保藏技术，以及由于缺少对鹅肝的基础营养指标数据，难于对消费者进行鹅肝食用的科学化膳食指导。

（二）研究目的与意义

本项目主要针对鹅肝生产加工中鹅肝蛋白对鹅肝产品品质形成机制的关键技术问题开展相关研究，企业重点关注肝脏的重要营养指标确定以及鹅肝蛋白的提取。江苏省是农业大省，畜牧养殖和畜禽产品加工在农业生产总值中占有重要地位。扬州鹅是有名的地方优良品种，鹅肝是优质美味的动物副产物。通过本项目的实施，将带动我省鹅业养殖和屠宰加工企业的技术升级和改造，提高鹅肝这种重要蛋白原料的加工性质。

（三）企业的任务分配

配合项目主持单位-南京农业大学进行扬州鹅鹅肝的采样工作，并联合进行鹅肝中主要营养指标的测定。根据项目的研究发现，制订原料鹅肝生产的品质控制规程，生产优质产品供应深加工厂家。

三、研究工作的组织过程

（一）、项目组织过程

1、根据本课题的实际情况，采用了二级管理体制，即课题领导小组和课题

科研小组。课题领导小组主要负责课题的组织和协调，包括技术方案的论证、科研基地的落实、科研经费的落实和分配、任务的分工、人员的调配等方面；课题科研小组对课题领导小组负责，主要开展具体的科研工作，包括科研计划的制定、实施、产业化过程中的技术问题、科研经费的使用、项目的总结等。

2、课题由南京农业大学牵头并作为技术支撑，我公司进行采样、及基础指标的工厂在线检测等配合。

3、明确课题的任务、分工和责任人，杜绝课题衔接的灰色区域，做到既分工又合作。

4、实行定期召开企业的技术培训会议，将项目的成果及时应用到企业的生产实践中来。

(二)、主要参加人员

姓名	性别	年龄	职称	从事专业	为本项目工作时间%	所在单位
徐幸莲	女	52	正高	食品科学	80	南京农业大学
吉鉴宏	男	57	副高	管理学	60	扬州天歌鹅业发展有限公司
熊国远	男	39	副高	食品科学	90	南京农业大学
王 鹏	男	35	副高	食品科学	30	南京农业大学
李春保	男	36	副高	食品科学	20	南京农业大学
邓紹林	男	28	中级	食品科学	30	南京农业大学
韩敏义	男	39	中级	食品科学	30	南京农业大学
白 云	女	30	中级	食品科学	40	南京农业大学
张 勇	男	42	中级	经济学	40	扬州天歌鹅业发展有限公司
包 庆	女	49	副高	食品科学	40	扬州天歌鹅业发展有限公司
朱春兰	女	48	中级	食品科学	40	扬州天歌鹅业发展有限公司

四、企业取得的主要成果

在项目的实施过程中，我公司将项目中基于肝蛋白功能性质的原料鹅肝品质控制技术应用到生产实践中，极大提升了我公司鹅肝产品的品质。项目实施过程中，南京农业大学为企业进行了技术培训，提升了员工的质量控制执行力。本项目执行期间公司共生产优质鹅肝产品 12000 kg，并根据项目的研究结果对鹅肝的营养价值进行了广泛宣传，总体上看产生了显著的经济和社会效益。

五、是否同意项目验收

同意项目验收

证书号第 1865176 号



发明专利证书

发明名称：一种可食用禽肝脏蛋白的提取方法

发明人：徐幸莲；熊国远；王鹏；周光宏

专利号：ZL 2014 1 0179630. X

专利申请日：2014 年 04 月 30 日

专利权人：南京农业大学

授权公告日：2015 年 12 月 02 日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 04 月 30 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



证书号第 1931300 号



发明专利证书

发明名称: 富含不饱和脂肪酸的涂抹型禽肝酱及其制作方法

发明人: 徐幸莲;熊国远;韩敏义;周光宏

专利号: ZL 2014 1 0179631.4

专利申请日: 2014 年 04 月 30 日

专利权人: 南京农业大学

授权公告日: 2016 年 01 月 20 日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查, 决定授予专利权, 颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年, 自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 04 月 30 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的, 专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



证书号第1758618号



发明专利证书

发明名称：低温涂抹型禽肝酱及其生产方法

发明人：熊国远；徐幸莲；周光宏；王鹏

专利号：ZL 2014 1 0179632.9

专利申请日：2014年04月30日

专利权人：南京农业大学

授权公告日：2015年08月19日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年04月30日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。


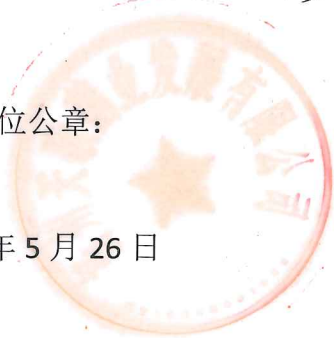


局长
申长雨

申长雨



应用证明

项目名称	基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究		
应用单位	扬州天歌鹅业发展有限公司		
通信地址			
邮政编码			
单位负责人	吉鉴宏		
联系电话	13013717920		
应用起始时间	2014 年 7 月		
经济效益（单位：万元人民币）			
年份	新增产值	新增利润	新增税收
2014	115	10.5	5.3
2015	155	16.3	6.2
2016	170	19.1	8.8
<p>应用情况及社会效益：</p> <p>我公司与南京农业大学共同承担了前瞻性研究项目《基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究》。在项目的实施过程中，我公司将项目中基于肝蛋白功能性质的原料鹅肝品质控制技术应用到生产实践中，极大提升了我公司鹅肝产品的品质。项目实施过程中，共生产优质鹅肝产品 12000 kg，产生了显著的经济和社会效益。</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> 单位负责人（签字）： </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> 应用单位公章： </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> 2017 年 5 月 26 日 </div>			

应用证明

项目名称	基于蛋白组学和分子动力学的鹅肝蛋白加工特性研究		
应用单位	扬州翔龙禽业发展有限公司		
通信地址	江苏省扬州市江都区邵伯镇小街 2 号		
邮政编码	225261		
单位负责人	黎寿丰		
联系电话	13705250841		
应用起始时间	2015 年 1 月		
经济效益（单位：万元人民币）			
年份	新增产值	新增利润	新增税收
2015	85	52.3	6.2
2016	170	11.1	10.8
<p>应用情况及社会效益：</p> <p>扬州翔龙禽业发展有限公司自 2015 年 1 月开始应用南京农业大学的原料鸡肝品质评价及鸡肝加工特性调控技术。解决了异质鸡肝的评价、冷冻等因素对鸡肝加工质量产生影响的问题，产生了显著的经济和社会效益。</p> <p style="text-align: right;">单位负责人（签字）： </p> <p style="text-align: center;">应用单位公章：  2017 年 5 月 8 日</p>			

ORIGINAL ARTICLE

Comparison on the physico-chemical and nutritional qualities of normal and abnormal colored fresh chicken liver

Guoyuan XIONG,^{1,2} Xueqin GAO,³ Haibo ZHENG,¹ Xin LI,¹ Xinglian XU¹ and Guanghong ZHOU¹

¹College of Tea and Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, ²Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou, ³Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Innovation Center of Meat Production and Processing, Nanjing Agricultural University, Nanjing, China

ABSTRACT

This study evaluated the differences of physico-chemical and nutritional qualities between abnormal colored chicken livers (ANCCLs) and normal colored chicken livers (NCCLs) and the safety of the both livers. Compared with NCCLs, ANCCLs were lower in protein, water contents ($P < 0.01$), pH and pigment contents ($P < 0.05$). NCCLs contained higher polyunsaturated fatty acid (PUFA) and saturated fatty acids (SFA) ($P < 0.05$). The PUFA/SFA ratio of NCCLs was 0.453, higher ($P < 0.05$) than that of ANCCLs. The contents of alanine, valine, tyrosine, lysine and histidine in NCCLs were higher ($P < 0.05$) than in ANCCLs. The contents of K, Na, P, Cu, Fe and Se of NCCLs were higher ($P < 0.05$), but the Ca content was lower ($P < 0.05$). The content of the heavy metals (As, Hg, Pb and Cd) of the two types of livers complied with food safety requirements. Although NCCLs had higher nutritional value than ANCCLs, both livers were acceptable for human consumption.

Key words: amino acids, discoloration liver, fatty acids, physico-chemical characteristics, trace elements.

INTRODUCTION

The world production of chicken meat in 2014 reached about 93 million Mt, of which China accounted for 14 million Mt (FAO 2014). Chicken liver, an edible meat by-product, constitutes about 2–2.5% of their live weight (Chen 2006) and assuming a dressing percentage of 65%, it can be calculated that about 3.0 million Mt (or 0.5 million Mt for China) of chicken liver is produced annually. Therefore, there would be a large economic benefit if chicken liver could be fully utilized. Normal colored chicken livers (NCCLs) are rich in minerals, amino acids, proteins and vitamins (Abu-Salem & Abou Arab 2010) and can provide a rich and economical source of many essential nutrients for humans. However, a large number of abnormal colored chicken livers (ANCCLs) are produced in large-scale broiler breeding and slaughtering plants, possibly resulting from feeding regimens and stressful conditions. The proportion of ANCCLs can be estimated to be about 20% in China. This liver discoloration in chickens has also been reported in the USA (King & Chen 1998). In China, ANCCLs are usually considered unsafe, with no nutrition and no value and are discarded due to their unpleasant abnormal color. However, in Europe there

are great amounts of foie-gras made of fatty liver usually exhibiting abnormal color (light yellow color).

NCCLs (Fig. 1A) appear reddish or reddish-brown in color which is the familiar color expected by consumers. However, ANCCLs (Fig. 1B) are light reddish in color, appearing mainly as light yellow, yellow-brown or loess color. Clark and Das (1974) reported that stress had an effect on the liver, causing it to become fatty, pale and yellowish color. McCormick (1990) observed fatty liver syndrome in chickens having abnormal accumulations of lipids which led to the formation of ANCCLs. Li *et al.* (2006) and Yan and Gao (2013) indicated that ANCCLs resulted from chicken liver denaturation and proposed a mechanism for its formation which is related to individual chicken metabolism. However, the physico-chemical and nutritional quality of ANCCLs and the differences compared with NCCLs are not fully investigated. Also the safety of ANCCLs has not been evaluated

Correspondence: Xinglian Xu, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China. (Email: xlxus@njau.edu.cn)

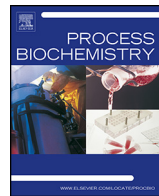
Received 31 December 2015; accepted for publication 16 August 2016.

ACKNOWLEDGMENTS

The research was financially supported by the fourth '333' funded research project of Jiangsu, Prospective joint research project of Jiangsu (BY2014128-02), Chinese Agriculture Research System (CARS-42), National Science Foundation of China (2013BAD20B05) and Anhui Chilled-fresh Meat Process and Quality Control Engineering Technology Research Project of China (201206G01035).

REFERENCES

- Abu-Salem FM, Abou Arab EA. 2010. Chemical properties, microbiological quality and sensory evaluation of chicken and duck liver paste (foie gras). *Grasas y Aceites* **61**, 126–135.
- AOAC. 1995. *Official methods of analysis of AOAC International*, 16th edn. AOAC International, Arlington, VA, USA.
- AOAC. 2005. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 18th edn. Arlington, VA, USA.
- Chen GY. 2006. Chicken is also delicious-Economical but nutritive food, is easy to ignored. *Guide to Chinese Poultry* **23**, 33.
- Chen Y, Zong Z. 2013. Measurement and analysis of Lueyang Crown chicken meat and liver nutrients. *Journal of Hubei Agricultural Science* **52**, 3402–3405.
- Chinese Food Health Criterion. 2012. Maximum Levels of Contaminants in Foods, In: *GB 2762–2012[S]*. Ministry of Health of the People's Republic of China, China.
- Clark C, Das G. 1974. Effect of high environmental temperature on internal organs of chickens. *Poultry Science* **53**, 859–863.
- Codex Committee on Food Additives and Contaminants. 2001. Comments Submitted on Draft Maximum Levels for Lead and Cadmium. Agenda 16c/16d, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 33rd Session, The Hague, The Netherlands, 12–16 March.
- Commission of the European Communities. 2001. Commission Regulation (EC) No. 221/2002 of 6 February 2002 amending regulation (EC) No. 466/2002 setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. Official Journal of the European Communities, Brussels, 6 February 2002.
- FAO. 2014. FAOSTAT Domains, <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QL/E..> Rome, Food and Agriculture organization of the United Nations; [Cited 23 October 2014]. Available from URL: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **226**, 497–509.
- Gandemer G. 2002. Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science* **62**, 309–321.
- Gandemer G, Morvan-Mahi B, Meynier A, Leperq M. 1991. Quantitative and qualitative analysis of free fatty acids in meat products using ion exchange resin. *Proceedings of 37th congress of meat science and technology*, Kulmbach.
- Guanru C. 2006. Chicken liver is good things- neglected and nutritious food. *Guide to Chinese Poultry* **23**, 33.
- Hrynets Y, Omana DA, Xu Y, Betti M. 2010. Effect of Acid-and Alkaline-Aided Extractions on Functional and Rheological Properties of Proteins Recovered from Mechanically Separated Turkey Meat (MSTM). *Journal of Food Science* **75**, E477–E486.
- King Y, Chen T. 1998. Chemical and Physical Characteristics of Chicken Livers Following Adrenocorticotrophic Hormone-induced Stress. *Journal of Food Science* **63**, 589–591.
- Lei B, Chen L, Hao Y, Cao T, Zhang X, Yu Y, *et al.* 2013. Trace elements in animal-based food from Shanghai markets and associated human daily intake and uptake estimation considering bioaccessibility. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **96**, 160–167.
- Lesiow T, Xiong YL. 2003. Chicken muscle homogenate gelation properties: effect of pH and muscle fiber type. *Meat Science* **64**, 399–403.
- Li W, Zhang H, Diao H, Liu B. 2006. The formation and treatment of denaturation liver in normal slaughter animal. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine* **7**, 17.
- McCormick C. 1990. Symposium: Liver catabolism in the chicken. *Introduction. Poultry Science* **69**, 1182.
- Nkukwana TT, Muchenje V, Masika PJ, Hoffman LC, Dzama K, Descalzo AM. 2014. Fatty acid composition and oxidative stability of breast meat from broiler chickens supplemented with Moringa oleifera leaf meal over a period of refrigeration. *Food Chemistry* **142**, 255–261.
- Onianwa P, Adeyemo A, Idowu O, Ogiabla E. 2001. Copper and zinc contents of Nigerian foods and estimates of the adult dietary intakes. *Food Chemistry* **72**, 89–95.
- Ramirez-Suárez J, Xiong Y. 2003. Effect of transglutaminase-induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures. *Meat Science* **65**, 899–907.
- SAS. 2002. *SAS/STAT guide for personal computers*, version 8.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- WHO. 1990. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, In: *WHO Technical Report Series 797*. World Health Organization, Geneva.
- WHO/FAO/UNU. 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition. *Report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation. WHO Technical Report Series 935*. World Health Organization, Geneva.
- Xiong G, Han M, Kang Z, Zhao Y, Xu X, Zhu Y. 2016. Evaluation of protein structural changes and water mobility in chicken liver paste batters prepared with plant oil substituting pork back-fat combined with pre-emulsification. *Food Chemistry* **196**, 388–395.
- Yan XF, Gao CW. 2013. Discussion of control chicken liver denaturation syndrome. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine* **3**, 121–122.



Comparative study of extraction efficiency and composition of protein recovered from chicken liver by acid–alkaline treatment



Xiong Guoyuan^{a,b}, Gao Xueqin^{c,1}, Wang Peng^a, Xu Xinglian^{a,*}, Zhou Guanghong^a

^a Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Innovation Center of Meat Production and Processing, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, People's Republic of China

^b Animal Husbandry and Veterinary Institute, Anhui Agricultural Science Academy, Hefei, Anhui 230031, People's Republic of China

^c Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou, Henan 450011, People's Republic of China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2016

Received in revised form 6 July 2016

Accepted 7 July 2016

Available online 11 July 2016

Keywords:

Acid and alkaline extractions

Chicken liver

Recovered protein

ABSTRACT

This study focused on the extraction efficiency and composition of proteins recovered from chicken liver after extraction by acid/alkaline solubilization (pH 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5) and (pH 10.5, 11.0, 11.5 and 12.0) and precipitation in pH 5.5. The highest extracted protein yield was obtained at pH values of 2.0, 11.5 and 12.0 (77.9%, 78.4% and 79.3% respectively), and the lowest yield (58.5%) was obtained at pH 3.5. Extraction of salt-soluble proteins was attributed to pH 3.0 and 3.5, whereas pH 10.5, 11.0 and 11.5 extracted more water-soluble proteins. Both acidic and alkaline solubilization extracted lots of insoluble proteins. The total pigment contents achieved by acid treatment were significantly higher ($P < 0.05$) than those by alkaline treatment. The highest total pigment content was observed at pH 2.5. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) profiles indicated higher concentrations of myosin heavy chains (MHCs) and actin by alkaline extraction than acid treatment. In one word, this method of recovering valuable protein components by acid–alkaline treatment helps to produce innovative products and leads to an increased consumption of chicken liver by humans.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The interest in the use of meat by-products as food source and food ingredient has been increasing in recent years, because of their many functional and nutritional properties. The worldwide production of chicken meat in 2014 was about 93 million MT [1]. Chicken liver, an important edible meat by-product, constitutes approximately 2–2.5% of the live weight of chicken [2], and assuming a dressing percentage of 65, it can be calculated that approximately 1.4 million MT of chicken liver is obtained annually worldwide and is readily available for utilization. Raw chicken liver can provide a rich and economical source of many essential nutrients for humans, including proteins, fat, minerals, and vitamins, among which protein constitutes the highest proportion (24.6%) [3]. However, in developing countries, chicken liver has low commercial value and is less processed and underutilized compared with the liver of other animals. For example, in China, a certain

quantity of chicken liver is used for human consumption in fresh form, and the remaining is used as animal feed. Only a minor quantity of chicken liver is used for further processing. On the contrary, the increasing consumption of chicken meat will generate higher amounts of valuable chicken liver in the future. The use of chicken liver to produce high-quality proteins would not only be beneficial for the industry, but also provide protein products with high nutritive value. Therefore, the key problem is to find economic ways to transform these underutilized protein resources into human foods, to meet the practical production demand.

Liver represents an important source of protein with functional characteristics associated with different protein fractions and physicochemical conditions such as pH, ionic strength, and specific processing cases. Several studies have been conducted on the utilization of recovered fish proteins [4,5], chicken dark meat proteins [6,7], mechanically separated turkey meat proteins, and chicken meat [8] by acid–alkaline treatment. These studies showed that the recovered proteins exhibited higher recovery yields and improved functionalities than the conventional proteins (e.g., water extract). However, to the best of the authors' knowledge, there have been no published studies on the acid–alkaline processing of chicken liver till date.

* Corresponding author.

E-mail address: xlxus@njau.edu.cn (X. Xu).

¹ Gao Xueqin contributed equally to this work and should be considered co-first author.

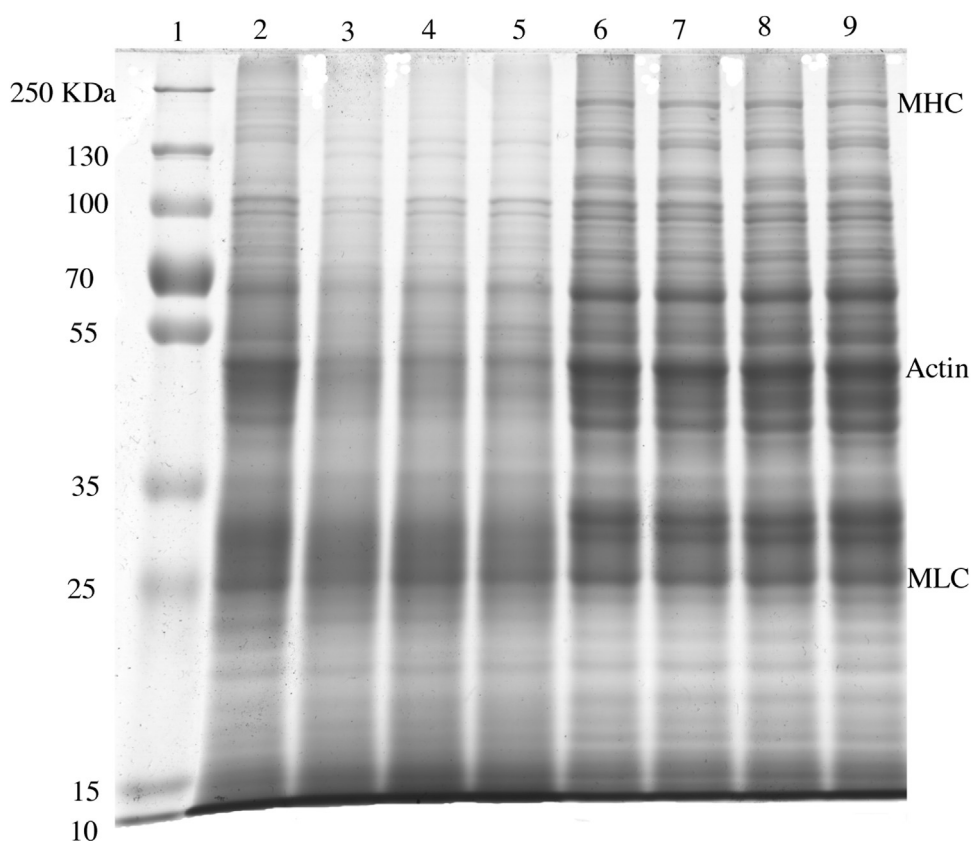


Fig. 5. SDS-PAGE profiles of protein recovered from chicken livers using different extraction pHs. Lane 1: standard marker; lane 2–9: recovered chicken liver proteins after extracting at pH 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 10.5, 11.0, 11.5, and 12.0, respectively. MHC–myosin heavy chains. MLC–myosin light chains.

protein yields at these pH values. The highest total protein recovery yield was achieved at pH 12.0. Different pH values have different effects on recovered protein categories. The pH 3.0 and 3.5 contributed to the extraction of salt-soluble protein, whereas pH 10.5, 11.0 and 11.5 probably extracted more water-soluble protein. The SDS-PAGE profiles at pH 12.0 were associated with higher concentration of MHCs and actin by alkaline extraction than acid treatment in chicken liver. In conclusion, both acid and alkaline extractions have specific advantages. Hence, this method of recovery of valuable protein components from underutilized chicken liver helps to produce innovative new products and leads to an increased consumption of animal liver by humans.

Acknowledgments

This study was financially supported by the fourth “333” funded research project of Jiangsu, Prospective joint research project of Jiangsu (BY2014128-02), Chinese Agriculture Research System (CARS-42), the National Natural Science Foundation of China (NSFC, Grant No. 31171707), and Anhui Chilled-fresh Meat Process and Quality Control Engineering Technology Research Project of China (201206G01035). The authors also thank Prof. Dr Hubert Paelinck and Dr Ilse Fraeye from the research group of Technology and Quality of Animal Product in KU Leuven, Belgium, for their valuable comments.

References

- [1] FAO. FAOSTAT Domains, <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QL/E>. Rome, URL:<http://faostatfaoorg/site/339/default.aspx>: Food and Agriculture organization of the United Nations; 2014.
- [2] G.Y. Chen, Chicken is also delicious-economical but nutritive food, is easy to ignored, *Guide Chin. Poult.* 23 (2006) 33.
- [3] F.M. Abu-Salem, E.A. Abou Arab, Chemical properties, microbiological quality and sensory evaluation of chicken and duck liver paste (foie gras), *Grasas Aceites* 61 (2010) 126–135.
- [4] B. Ingadottir, The use of acid and alkali-aided protein solubilization and precipitation methods to produce functional protein ingredients from tilapia, University of Florida, 2004.
- [5] H. Nolsøe, I. Undeland, The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art, *Food Bioprocess Technol.* 2 (2009) 1–27.
- [6] Y. Hrynets, D.A. Omana, Y. Xu, M. Betti, Comparative study on the effect of acid-and alkaline-aided extractions on mechanically separated turkey meat (MSTM): chemical characteristics of recovered proteins, *Process Biochem.* 46 (2011) 335–343.
- [7] T. Yang, G. Froning, Changes in myofibrillar protein and collagen content of mechanically deboned chicken meat due to washing and screening, *Poult. Sci.* 71 (1992) 1221–1227.
- [8] G. Ozimek, P. Jelen, L. Ozimek, W. Sauer, S. McCurdy, A comparison of mechanically separated and alkali extracted chicken protein for functional and nutritional properties, *J. Food Sci.* 51 (1986) 749–753.
- [9] G. Xiong, M. Han, Z. Kang, Y. Zhao, X. Xu, Y. Zhu, Evaluation of protein structural changes and water mobility in chicken liver paste batters prepared with plant oil substituting pork back-fat combined with pre-emulsification, *Food Chem.* 196 (2016) 388–395.
- [10] AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 18th ed. Arlington, VA, USA, 2005.
- [11] Y.S. Kim, J.W. Park, Y.J. Choi, New approaches for the effective recovery of fish proteins and their physicochemical characteristics, *Fish. Sci.* 69 (2003) 1231–1239.
- [12] H.O. Hultin, S.D. Kelleher, Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition: Google Patents; 1999.
- [13] H.O. Hultin, S.D. Kelleher, High efficiency alkaline protein extraction: Google Patents; 2000.
- [14] Y. Hrynets, D.A. Omana, Y. Xu, M. Betti, Effect of acid-and alkaline-aided extractions on functional and rheological properties of proteins recovered from mechanically separated Turkey meat (MSTM), *J. Food Sci.* 75 (2010) 477–486.
- [15] S. Coffrades, A. Serrano, J. Ayo, J. Carballo, F. Jiménez-Colmenero, Characteristics of meat batters with added native and preheated defatted walnut, *Food Chem.* 107 (2008) 1506–1514.
- [16] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.



Evaluation of protein structural changes and water mobility in chicken liver paste batters prepared with plant oil substituting pork back-fat combined with pre-emulsification



Guoyuan Xiong^{a,b}, Minyi Han^a, Zhuangli Kang^a, Yingying Zhao^a, Xinglian Xu^{a,*}, Yingying Zhu^a

^a Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Meat Production and Processing, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

^b Animal Husbandry and Veterinary Institute, Anhui Academy Agricultural Science, Hefei 230031, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2015

Received in revised form 28 August 2015

Accepted 16 September 2015

Keywords:

Chicken liver paste batters

Plant oil substitution

Pre-emulsification

Pork back-fat

Water distribution

Protein structure

Raman spectroscopy

ABSTRACT

Protein structural changes and water mobility properties in chicken liver paste batters prepared with plant oil (sunflower and canola oil combinations) substituting 0–40% pork back-fat combined with pre-emulsification were studied by Raman spectroscopy and low-field nuclear magnetic resonance (NMR). Results showed that pre-emulsifying back-fat and plant oil, including substituting higher than 20% back-fat with plant oil increased the water- and fat-binding ($p < 0.05$) properties, formed more even and fine microstructures, and gradually decreased the NMR relaxation times (T_{21a} , T_{21b} and T_{22}), which was related to the lower fluid losses in chicken liver paste batters. Raman spectroscopy revealed that compared with a control, there was a decrease ($p < 0.05$) in α -helix content accompanied by an increase ($p < 0.05$) in β -sheet structure when substituting 20–40% back-fat with plant oil combined with pre-emulsification. Pre-emulsification and plant oil substitution changed tryptophan and tyrosine doublet hydrophobic residues in chicken liver paste batters.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Liver pâté products are popular meat products consumed throughout the world and are renowned for their sensory properties, being highly flavoursome with a soft and spreadable texture. Traditionally, liver pâté is produced from pork liver and pork fat. In some regions in France, “pâté” is prepared with goose liver (called “pâté de foie gras”, literal: “fat/gras liver/foie”, or simply “foie gras”). For cost reasons, chicken livers are also used to produce liver pâté products. Generally, liver pâté products are classified according to processed raw (e.g., liver sausage) or precooked pork back-fat (e.g., spreadable liver pâté) (Allais, 2010). Both products are essentially emulsified meat products consisting of a weak gel (Morales-Irigoyen, Severiano-Perez, Rodriguez-Huezo, & Totosa, 2012; Steen et al., 2014).

Spreadable chicken liver pastes are manufactured with chicken liver, precooked pork back-fat, water, sodium caseinate and small amounts of other additives, and are regarded as high in animal fat content (35–50%). Plant oils, which are regarded as healthy options because of their high polyunsaturated fatty acid (PUFA)

contents have been used to partially substitute animal fats in reformulated meat products. However, there are a limited number publications dealing with the effect of substitution of animal fats with plant oils on liver pâté (Hong, Lee, & Min, 2004; Martin, Ruiz, Kivikari, & Puolanne, 2008; Morales-Irigoyen et al., 2012). These researchers investigated the effects of substitution of pork back-fat with plant oils (canola oil or soybean oil or olive oil, respectively) on the fatty acid profiles, cooking loss, rheological characteristics and texture of liver paste. However, the effects of structural changes in protein and water distribution characteristics of chicken liver paste batters were not investigated in these studies. In addition, the effects of sunflower and canola oil combinations substituting pork back-fat and of pre-emulsification of pork back-fat on the properties of chicken liver paste batters have not yet been investigated. When partially substituting pork back-fat with plant oil, it is common to simply pre-emulsify the plant oil with non-meat proteins at first, and then add pork back-fat to processed meat products. Generally, it has not been investigated if pre-emulsification of pork back-fat and different levels of plant oil together affects the protein structure and water mobility characteristics of meat products. Sunflower and canola oil have 88% and 92% PUFA per 100 g respectively (Shanghai Jiage Food Company, China). Emulsified pork back-fat and different proportions of

* Corresponding author.

E-mail address: xlxus@njau.edu.cn (X. Xu).

chopping caused the tyrosine residues to be exposed where raw meat batters were produced with different lipids. Compared to C, the ratio values of those treatments where pork back-fat was replaced in the pre-emulsification step were significantly ($p < 0.05$) decreased. Among the P0–P30 treatments (where fat substitution was less than 40% plant oil), there was no significant difference ($p > 0.05$). However, substitution with 40% (P40) significantly ($p < 0.05$) decreased the ratios of I850/I830 compared to P0 and P10, indicating that substitution of 40% pork back-fat with plant oils enabled the tyrosine residues to become more buried in the environment.

Proteins are composed of hydrophilic and hydrophobic polypeptide side-chains (Das & Kinsella, 1990). The hydrophilic side-chains tend to be located towards, and interfaced with the aqueous phase, whereas the hydrophobic side chains are selectively located, at least partly, within the oil phase. This involves interactions between structurally dissimilar acyl and protein chains, and can cause disordering of the lipid chains, resulting in strong fat-binding capacities (Shao et al., 2011). Pre-emulsification with an optimal proportion of plant oils can induce the exposure of the hydrophobic groups of tryptophan residues and bury hydrophobic groups of tyrosine residues. This may explain the changes in WFB and the microstructure of chicken liver paste batters as influenced by pre-emulsification and substitution of pork back-fat with plant oils.

4. Conclusions

In conclusion, substituting appropriate proportions (higher than 20%) of pork back-fat with plant oil combined with a pre-emulsification step affected protein structure changes and water distribution in chicken liver paste batters. Pre-emulsifying the pork back-fat led to formation of fine microstructure, a decrease in water mobility, and an exposure of hydrophilic groups of proteins, resulting in improved WFB properties of chicken liver paste batters. Furthermore, substituting more than 20% pork back-fat with plant oil combined with pre-emulsification induced changes such as a reduction of α -helical structure and a concomitant increase of β -sheets, increased burial of hydrophobic groups of protein, and trapped more immobilised or free water. These changes may provide an explanation for improving the WFB properties of the chicken liver paste batters. In addition, Raman spectroscopy analysis and low-field NMR were also proved to be useful tools for the study of specific structural components of proteins and water distribution in chicken liver paste batters prepared with plant oils substituting pork back-fat combined with a pre-emulsification step.

Acknowledgments

The research was financially supported by the fourth “333” funded research project of Jiangsu, Prospective joint research project of Jiangsu, Chinese Agriculture Research System (CARS-42), National Science Foundation of China (2013BAD20B05) and Anhui Chilled-fresh Meat Process and Quality Control Engineering Technology Research Project of China (201206G01035).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.068>.

References

- Abu-Salem, F. M., & Abou Arab, E. A. (2010). Chemical properties, microbiological quality and sensory evaluation of chicken and duck liver paste (foie gras). *Grasas y Aceites*, 61(2), 126–135.
- Alix, A., Pedanou, G., & Berjot, M. (1988). Fast determination of the quantitative secondary structure of proteins by using some parameters of the Raman amide I band. *Journal of Molecular Structure*, 174, 159–164.
- Allais, I. (2010). Emulsification. In F. Toldrà (Ed.), *Handbook of meat processing* (pp. 143–168). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Bertram, H. C., & Ersen, H. J. (2004). Applications of NMR in meat science. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 53, 157–202.
- Bertram, H. C., Purslow, P. P., & Andersen, H. J. (2002). Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: A low-field nuclear magnetic resonance study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 824–829.
- Bianchi, M., Capozzi, F., Cremonini, M. A., Laghi, L., Petracci, M., Placucci, G., & Cavani, C. (2004). Influence of the season on the relationships between NMR transverse relaxation data and water-holding capacity of turkey breast meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1535–1540.
- Bouraoui, M., Nakai, S., & Li-Chan, E. (1997). *In situ* investigation of protein structure in Pacific whiting surimi and gels using Raman spectroscopy. *Food Research International*, 30(1), 65–72.
- Carmona, P., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Pintado, T., & Herrero, A. M. (2011). Infrared study of structural characteristics of frankfurters formulated with olive oil-in-water emulsions stabilized with casein as pork backfat replacer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12998–13003.
- Chen, H., & Han, M. (2011). Raman spectroscopic study of the effects of microbial transglutaminase on heat-induced gelation of pork myofibrillar proteins and its relationship with textural characteristics. *Food Research International*, 44(5), 1514–1520.
- Das, K., & Kinsella, J. (1990). Stability of food emulsions: physicochemical role of protein and nonprotein emulsifiers. *Advances in Food and Nutrition Research*, 34, 81–201.
- Han, M., Zhang, Y., Fei, Y., Xu, X., & Zhou, G. (2009). Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. *European Food Research and Technology*, 228(4), 665–670.
- Herrero, A. M. (2008a). Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review. *Food Chemistry*, 107(4), 1642–1651.
- Herrero, A. M. (2008b). Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(6), 512–523.
- Herrero, A. M., Cambero, M., Ordóñez, J., Hoz, L. D. L., & Carmona, P. (2009). Plasma powder as cold-set binding agent for meat system: Rheological and Raman spectroscopy study. *Food Chemistry*, 113(2), 493–499.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2008). Raman spectroscopic determination of structural changes in meat batters upon soy protein addition and heat treatment. *Food Research International*, 41(7), 765–772.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., & Ruiz-Capillas, C. (2011). Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: Elucidation of protein-lipid interactions by infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 12–18.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., & Ruiz-Capillas, C. (2012). Lipid and protein structure analysis of frankfurters formulated with olive oil-in-water emulsion as animal fat replacer. *Food Chemistry*, 135(1), 133–139.
- Hong, G., Lee, S., & Min, S. (2004). Effects of replacement pork backfat with soybean oil on the quality characteristics of spreadable liver sausage. *Food Science and Biotechnology*, 13.
- Howell, N. K., Herman, H., & Li-Chan, E. C. Y. (2001). Elucidation of protein-lipid interactions in a lysozyme-corn oil system by Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1529–1533.
- Kang, Z.-L., Wang, P., Xu, X.-L., Zhu, C.-Z., Li, K., & Zhou, G.-H. (2014a). Effect of beating processing, as a means of reducing salt content in frankfurters: A physico-chemical and Raman spectroscopic study. *Meat Science*, 98(2), 171–177.
- Kang, Z.-L., Wang, P., Xu, X.-L., Zhu, C.-Z., Zou, Y.-F., Li, K., & Zhou, G.-H. (2014b). Effect of a beating process, as a means of reducing salt content in Chinese-style meatballs (kung-wan): A dynamic rheological and Raman spectroscopy study. *Meat Science*, 96(2), 669–674.
- Kuntz, I. J., & Kauzmann, W. (1974). Hydration of proteins and polypeptides. *Advances in Protein Chemistry*, 28, 239–345.
- Li-Chan, E. (1996). The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science & Technology*, 7(11), 361–370.
- Li-Chan, E., Nakai, S., & Hirotsuka, M. (1994). Raman spectroscopy as a probe of protein structure in food systems. In *Protein structure-function relationships in foods* (pp. 163–197). Springer.
- Martin, D., Ruiz, J., Kivikari, R., & Puolanne, E. (2008). Partial replacement of pork fat by conjugated linoleic acid and/or olive oil in liver pâtés: Effect on physicochemical characteristics and oxidative stability. *Meat Science*, 80(2), 496–504.
- Mitchell, J., Gladden, L. F., Chandrasekera, T. C., & Fordham, E. J. (2014). Low-field permanent magnets for industrial process and quality control. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 76, 1–60.

EFFECTS OF PLANT OIL COMBINATIONS SUBSTITUTING PORK BACK-FAT COMBINED WITH PRE-EMULSIFICATION ON PHYSICOCHEMICAL, TEXTURAL, MICROSTRUCTURAL AND SENSORY PROPERTIES OF SPREADABLE CHICKEN LIVER PÂTÉ

GUOYUAN XIONG^{1,2}, PENG WANG¹, HAIBO ZHENG¹, XINGLIAN XU^{1,3}, YINGYING ZHU¹ and GUANGHONG ZHOU¹

¹Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Innovation Center of Meat Production and Processing, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, P. R. China

²Animal Husbandry and Veterinary Institute, Anhui Academy Agricultural Science, Hefei, China

³Corresponding author.

TEL: + 86 25-843-95730;

FAX: + 86 25-843-95939;

EMAIL: xlxus@njau.edu.cn

Received for Publication March 10, 2015

Accepted for Publication October 19, 2015

10.1111/jfq.12199

ABSTRACT

The effect of plant oils (sunflower and canola oil combinations) substituting 0–40% pork back-fat combined with pre-emulsification on the fatty acid profile, color, cooking loss, texture, microstructure and sensory evaluation of spreadable chicken liver pâtés was investigated. Pre-emulsification back-fat and plant oils, compared with the nontreated, affected significantly ($P < 0.05$) the color, cooking loss, texture, microstructure and sensory evaluation of liver pâtés. As increasing the percentage of plant oils substituting back-fat from 10 to 40%, especially to 30 and 40%, the total saturated fatty acid content significantly decreased ($P < 0.05$), while polyunsaturated and monounsaturated fatty acid significantly increased ($P < 0.05$), and had even and fine microstructures, less cooking loss, spreadable texture and favored sensory evaluation. Therefore, a healthier spreadable chicken liver pâté can be formulated with plant oil combinations substituting 30–40% pork back-fat combined with pre-emulsification without adversely affecting eating quality.

PRACTICAL APPLICATIONS

Liver pâté products are traditional and popular meat products manufactured and consumed throughout the world. However, most liver pâté products show some negative health perception due to their high animal fat contents (about 35–50%) and high amounts of saturated fatty acids. How to substitute animal fat without sacrificing product quality is still a challenge for liver pâté. Furthermore, chicken liver pâtés are not widely manufactured and studied well. The aim of this study was to determine suitable proportions of substitution back-fat with plant oils (sunflower and canola oil combinations) which contain high amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and proper pre-emulsification the back-fat and plant oils method, and then fully utilize chicken liver to produce more healthy spreadable chicken liver pâté to meet consumer's needs.

INTRODUCTION

Liver pâté products are traditional meat products manufactured and consumed throughout the world, especially in Europe (Steen *et al.* 2014) and recently, it has become

popular in China. Liver pâté products are made primarily with liver, lard (or back-fat), meat and spices, and are essentially emulsified meat products (Morales-Irigoyen *et al.* 2012) and are very favored. Unfortunately, liver pâté

TABLE 6. COMPARISONS OF SENSORY QUALITY INDICES OF VARIOUS SPREADABLE CHICKEN LIVER PÂTÉS

Treatments	Taste	Odor	Appearance	Texture	Overall acceptability
C	7.70 ± 0.265 ^b	8.367 ± 0.208 ^c	7.00 ± 0.265 ^b	7.00 ± 0.361 ^b	7.47 ± 0.306 ^b
T0	8.63 ± 0.152 ^a	8.53 ± 0.351 ^{bc}	8.80 ± 0.361 ^a	9.03 ± 0.208 ^a	8.93 ± 0.321 ^a
T1	8.60 ± 0.361 ^a	8.77 ± 0.153 ^{abc}	8.67 ± 0.551 ^a	8.80 ± 0.361 ^a	8.83 ± 0.503 ^a
T2	8.60 ± 0.265 ^a	8.97 ± 0.115 ^a	8.63 ± 0.351 ^a	8.73 ± 0.503 ^a	8.80 ± 0.400 ^a
T3	8.67 ± 0.416 ^a	9.00 ± 0.265 ^a	8.87 ± 0.208 ^a	8.77 ± 0.3321 ^a	8.77 ± 0.611 ^a
T4	8.47 ± 0.306 ^a	8.90 ± 0.100 ^{ab}	8.57 ± 0.351 ^a	8.70 ± 0.500 ^a	8.73 ± 0.451 ^a

For description of treatments see Table 1. Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

pre-emulsified. Hong *et al.* (2004a) mentioned that plant oils showed a better distribution than did animal fats in the emulsion mixture, as a consequence of the improved association with proteins. Cheong and Fischer (1993) concluded that the most effective emulsifier (monoglyceride of stearic acid) resulted in a high stability product with an even and fine distribution of fat particles which were completely covered with proteins when they used SEM to study the effect of emulsifiers in spreadable liver sausage. The dense, homogeneous and interactive protein matrix network was corresponded to the greater water- and fat-binding (WFB) (Sun *et al.* 2011) and to the favorite texture (Álvarez *et al.* 2012). As described in Figure 2 and Table 5, the cooking loss decreased (Fig. 2) and the soft and spreadable texture formed (Table 5) for chicken liver pâté when increased substitution proportion of back-fat with a plant oil combinations in the pre-emulsification step. It seems that pre-emulsification technique by addition of plant oil can induce the back-fat to be finer fat globules. When protein unfolded, aggregated and formed fine gel network upon cooking, the more obtained fine fat globules was well covered by proteins and favored a stable protein matrix, thereby changing their textural and cooking loss.

Sensory Evaluation

Significant differences were detected by the trained panel for liver pâté samples between the pre-emulsification treatments (T0, T1, T2, T3 and T4) and treatment (C) (no pre-emulsification) in taste, odor, appearance, texture and overall acceptability (Table 6). The liver pâté prepared with the pre-emulsification step had higher sensory values and was more acceptable than that prepared without the pre-emulsification step ($P < 0.05$). Thus, pre-emulsification of back-fat and plant oil can improve the sensory quality of spreadable chicken liver pâté. However, there were no significant differences found among the treatments where back-fat was substituted with various levels plant oil in the pre-emulsification step ($P > 0.05$) for sensory characteristics except for odor. Morales-Irigoyen *et al.* (2012) reported that pork liver pâté, irrespective of fat type used, had sensory characteristics that were described as having a creamy texture, a salty flavor and a liver odor. In our work, the odor was not only affected by

chicken liver odor, but was also affected by fat type, especially the sweet aroma of plant oil. Thus, This work showed that a healthier spreadable chicken liver pâté can be formulated with plant oil (sunflower and canola oil combinations) substituting 10–40% pork back-fat combined with pre-emulsification step without adversely affecting eating quality, compared with spreadable chicken liver pâté made using a no pre-emulsified back-fat.

CONCLUSIONS

The results obtained in this work clearly indicate that pre-emulsified back-fat and plant oils, compared with the non pre-emulsified back-fat treatment, had important effects on the quality and microstructure characteristic, and the plant oil combinations substituting 10–40% pork back-fat improved the fatty acids profiles of spreadable chicken liver pâté. Especially, substituting 30 and 40% pork back-fat with plant oil combinations and inclusion of a pre-emulsification step was optimal for good texture, cooking loss and nutrition, and also improved gel matrix structure of chicken liver pâté. In conclusion, a healthier spreadable chicken liver pâté can be formulated with sunflower and canola oil combinations substituting 30–40% pork back-fat combined with pre-emulsification. In this study, the experiments showed also that pre-emulsifying back-fat and plant oil is necessary in order to obtain desired quality of spreadable chicken liver pâté when adding pork back-fat or when substituting pork back-fat with plant oil to produce spreadable chicken liver pâté.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the fourth “333” funded research project of Jiangsu, Prospective joint research project of Jiangsu (BY2014128-02), Chinese Agriculture Research System (CARS-42), National Natural Science Foundation of China (NSFC, Grant No. 31171707), National Science Foundation of China (2013BAD20B05) and Anhui Chilled-fresh Meat Process and Quality Control Engineering Technology Research Project of China (201206G01035) for funding this work.