

# 冻藏对原料肉加工前后羧甲基赖氨酸和羧乙基赖氨酸含量的影响

张 昆<sup>1,2</sup>, 曾茂茂<sup>1,2</sup>, 何志勇<sup>1,2</sup>, 秦 昉<sup>1,2</sup>, 陈 洁<sup>1,2\*</sup>

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室 无锡 214122;

2. 江南大学食品安全国际合作实验室 无锡 214122)

**摘 要:** **目的** 探究冻藏对原料肉加工前后羧甲基赖氨酸(N<sup>ε</sup>-carboxymethyl-lysine, CML)和羧乙基赖氨酸(N<sup>ε</sup>-carboxyethyllysine, CEL)含量的影响。**方法** 以鸡胸肉为研究对象,使用反复冻融的方式模拟原料肉的冻藏过程,通过 TBARs 值与脂肪酸含量的变化评价原料肉脂肪氧化程度,同时考察原料肉与烤制后其中 CML 和 CEL 的含量。**结果** 反复冻融会造成原料肉的汁液损失,游离氨基酸含量增加。在冻融前期(0~2 cycles)脂肪氧化程度较低, TBARs 值为 0.25 mg/kg,后期(4~6 cycles)程度加大, TBARs 值为 0.53 mg/kg。未冻融的新鲜原料肉中的 CML 及 CEL 含量均为最低,经 1 次冻融后 CEL 含量增加一倍达到(165.01±2.33)(μg/g 干基), CML 含量增加不显著(P>0.05)。热加工后肉饼中 CEL 含量随原料肉冻融次数逐渐升高,于第 6 次冻融后达到最高值 133.26±7.16(μg/g 肉饼),与鲜肉对比含量增加 15%,同时 CML 的含量增加 44%。**结论** 冻藏过程中,原料肉的反复冻融会导致脂肪氧化, CML 和 CEL 的累积,同时会影响热加工后肉制品的品质。

**关键词:** 羧甲基赖氨酸; 羧乙基赖氨酸; 原料肉; 反复冻融; 脂肪氧化

## Effect of frozen storage on the content of N<sup>ε</sup>-carboxy-methyl-lysine and N<sup>ε</sup>-carboxyethyl-lysine before and after processing of raw meat

ZHANG Kun<sup>1,2</sup>, ZENG Mao-Mao<sup>1,2</sup>, HE Zhi-Yong<sup>1,2</sup>, QIN Fang<sup>1,2</sup>, CHEN Jie<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore the effect of frozen storage on the content of N<sup>ε</sup>-carboxymethyl-lysine (CML) and N<sup>ε</sup>-carboxyethyllysine (CEL) before and after processing of raw meat. **Methods** Taking chicken breast as the research object, the freezing process of raw meat was simulated by repeated freeze-thaw method. The oxidation degree of raw meat fat was evaluated by the change of TBARs value and fatty acid content, and the content of carboxymethyl lysine and carboxyethyl lysine in raw meat and roasted meat were also investigated. **Results** Repeated freezing and thawing would cause juice loss of raw meat and increase of free amino acid content. In the early stage of freeze-thaw (0~2 cycles), the degree of fat oxidation was low, the TBARs value was 0.25 mg/kg, and the late stage (4~6 cycles) was increased, the TBARs value was 0.53 mg/kg. The content of CML and CEL in the unfrozen and fresh raw meat was the lowest. After one freeze-thaw, the CEL content doubled to (165.01±2.33) (μg/g

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401575)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31401575)

\*通讯作者: 陈洁, 教授, 主要研究方向为食品加工与组分变化。E-mail: chenjie@jiangnan.edu.cn

\*Corresponding author: CHEN Jie, Professor, School of Food Science and Technology, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China. E-mail: chenjie@jiangnan.edu.cn

dry basis), and the CML content increased not significantly ( $P>0.05$ ). The content of CEL in the meat cake after hot processing gradually increased with the frozen and thaw times of raw materials. After the sixth freeze-thaw, the highest value reached ( $133.26\pm 7.16$ ) ( $\mu\text{g/g}$  patties), and the content of fresh meat increased by 15%, while the content of CML increased by 44%. **Conclusion** During the freezing process, repeated freezing and thawing of the raw meat will lead to fat oxidation and the accumulation of CML and CEL, and affect the quality of the meat after hot processing.

**KEY WORDS:**  $\text{N}^{\epsilon}$ -carboxy-methyl-lysine;  $\text{N}^{\epsilon}$ -carboxyethyl-lysine; raw meat; repeated freeze-thaw cycles; lipid oxidation

## 1 引言

晚期糖基化末端终产物 (advanced glycation end-products, AGEs) 是由还原糖与蛋白质或氨基酸经过复杂美拉德反应之后所生成一系列交联产物。摄入过量晚期糖基化末端终产物, 会在人体内累积, 研究已证实该类化合物与多种慢性疾病有关, 如肾衰竭、糖尿病、动脉粥样硬化、肿瘤和老年痴呆等<sup>[1,2]</sup>。食物中晚期糖基化末端终产物的形成途径主要为美拉德反应和脂质氧化<sup>[3]</sup>。常见的晚期糖基化末端终产物中有羧甲基赖氨酸( $\text{N}^{\epsilon}$ -carboxymethyl-lysine, CML)和羧乙基赖氨酸( $\text{N}^{\epsilon}$ -carboxyethyllysine, CEL)。CML 通过  $\text{N}^{\epsilon}$ -果糖基赖氨酸(fructosyllysine, FL)的氧化和乙二醛(glyoxal, GO)与赖氨酸或精氨酸残基的反应形成, 并且 CEL 通过甲基乙二醛(methylglyoxal, MGO)与美拉德反应中的赖氨酸残基的反应产生。在脂质氧化途径中, 脂质氧化中形成的赖氨酸残基与二羰基(如 GO 和 MGO)之间的反应将导致 CML 和 CEL 的形成。食品成分(糖、蛋白质、脂肪、水等)、贮藏方法(贮藏温度、时间、水分、气体等)以及加工方法(蒸煮、煮沸、煎炸、烘焙、焙烧等)均会影响 AGEs 的生成<sup>[4]</sup>。

肉制品富含优质蛋白, 是膳食 AGEs 的主要来源, 所以了解肉制品中 AGEs 累积水平非常重要。无论是商业运输或家庭储存, 冷冻储存的方式被普遍用来延缓生肉品质的恶化, 从而延长货架期。冻藏过程中肉制品品质的研究已较为普遍, 冻藏过程中生肉内一系列反应仍在进行, 如脂质氧化、蛋白质变性及水解等<sup>[5-8]</sup>。冻藏可以抑制肉中蛋白质的水解速度, 但在解冻后蛋白质水解速度会显著升高, 同时冻结过程中肌肉纤维断裂会导致肉的持水力下降。反复冻融会使原料肉中脂质发生氧化<sup>[9]</sup>, 而肉制品中脂肪氧化产生的醛类会参与到 AGEs 的生成中<sup>[10]</sup>。

原料肉中 CML 及 CEL 的含量因种类不同而有所差异, 但针对长期储存的原料肉及其加工制品中 CML 及 CEL 含量研究较少, Niu 等<sup>[11]</sup>研究了鱼肉新鲜程度与 CML 及 CEL 生成含量间的关系, 鱼内在  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  储存时间越长, 热加工后形成的 CML 及 CEL 越高, 但文章未解释该现象与原料肉

氧化之间的联系。Yua 等<sup>[12]</sup>指出脂质氧化会促进 CML 及 CEL 的形成, 脂质氧化途径可能是肉制品贮藏过程中 CML 及 CEL 积累的重要途径。脂质氧化、蛋白氧化与美拉德反应三者途径有部分交叉, 脂质氧化的中间产物可能会参与或影响 CML 及 CEL 的生成。冷冻解冻循环广泛存在于肉类生产、销售及储存过程中, 是反映冻藏过程食物原料品质变化的加速试验, 因此研究冷冻贮藏过程中反复冻融对原料肉及其性质变化和后期加工热加工中 AGEs 生成的影响有重要意义。

本文中以鸡胸肉作为研究对象, 利用反复冻融模拟原料肉的冻藏过程, 随后热加工烤制制成肉饼。通过实验研究冻藏过程中, 原料肉脂质氧化与原料肉加工前后 AGEs 累积规律, 为原料肉加工冻藏相关研究提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

Alliance 2695 高效液相色谱仪、RI-2414 示差折光检测器(美国 Waters 公司); SCC61 型万能烤箱(美国 RATIONAL 公司); Visiprep<sup>TM</sup> 型固相萃取仪(美国 Supelco 公司); GC-2014 气相色谱仪(日本岛津公司); SP-2560 毛细管柱( $100\text{ m}\times 0.25\text{ mm}$ ,  $0.2\text{ }\mu\text{m}$ , 日本岛津公司); Venusil-AA 氨基酸分析专用柱( $100\text{ A}$ ,  $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ , 天津博纳艾杰尔科技有限公司); X-Bridge  $\text{C}_{18}$  色谱柱( $100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$ ,  $3.5\text{ }\mu\text{m}$ )、Oasis MCX cartridge 固相萃取柱(SPE,  $60\text{ mg}$ ,  $3\text{ cc}$ ,  $60\text{ }\mu\text{m}$ )、MCX 混合阳离子固相萃取柱( $3\text{ mL}$ ,  $60\text{ mg}$ )(美国 Waters 公司)。

CML 标准品、CEL 标准品、d4-CML 同位素内标、d4-CEL 同位素内标(纯度  $> 98\%$ , 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 十一烷酸与正亮氨酸标准品(纯度  $> 98\%$ , 上海百灵威试剂公司)。

乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 硫酸铜、硫酸钾、硫代巴比妥酸、无水醋酸钠、硼氢化钠、硼酸盐、三氯乙酸、三氯甲烷、三氟化硼、乙醚、正己烷、氨水、浓硫酸(分析纯, 国药集团); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 原料肉的冻融及烤制

鸡胸肉准确称量后密封在自封袋中,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻结 24 h 后,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下解冻 6 h。共解冻 6 次, 分为 5 组: 空白组(control)、冻融 1 次(1 cycle)、冻融 2 次(2 cycles)、冻融 4 次(4 cycles)、冻融 6 次(6 cycles)。解冻后生肉饼于  $225\text{ }^{\circ}\text{C}$  烤制 20 min, 10 min 翻一面。

### 2.2.2 解冻汁液损失及烤制损失的测定

鸡胸肉样本解冻后小心擦干并准确称量, 计算解冻汁液损失, 烤制结束后准确称量烤肉饼的质量计算烤制损失。

### 2.2.3 原料肉 TBARs 值的测定

取 2 g 肉样, 加入 5 mL 25% 三氯乙酸和 4 mL 蒸馏水, 高速匀浆 1 min 之后 1000 g 离心 20 min, 上清液通过滤纸过滤; 取 2 mL 滤液加 2 mL 0.02 mol/L 硫代巴比妥酸沸水浴 20 min, 流水冷却 5 min, 于 532 nm 波长处测定溶液吸光度。

### 2.2.4 原料肉脂肪酸含量的测定

称量 0.50 g 样品于三角瓶中, 加入十一烷酸内标, 使用 20 mL 三氯甲烷/甲醇溶液(1:1, *V:V*)提取, 过滤后挥干溶剂使用 25% 三氟化硼乙醚溶液  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  下酯化后, 正己烷进行提取, 随后使用岛津气相色谱仪 GC-2014 (带氢火焰离子化检测器)进行测定。具体条件如下: SP-2560 毛细管柱(100 m $\times$ 0.25 mm, 0.2  $\mu\text{m}$ ), 载气为  $\text{N}_2$ , 分流比 100:1, 进样体积 1  $\mu\text{L}$ , 进样口温度  $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 检测器温度  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 程序升温: 0~13 min,  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 维持 6 min; 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至  $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 维持 12 min; 4  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 保持 18 min。

### 2.2.5 氨基酸含量的测定

称取 1.0 g 样品用 5% 三氯乙酸(5 g/100 mL TCA)定容至 25 mL。常温超声 20 min 后静置 2 h。过滤离心得到游离氨基酸样液。总氨基酸的测试: 称取 100.0 mg 样品, 加 8 mL 6 mol/L HCL, 氮气保护后  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  水解 22 h。水解完成后加入 4.8 mL 10 mol/L NaOH 中和, 定容至 25 mL, 过滤离心得总氨基酸样液。取 200  $\mu\text{L}$  氨基酸样液, 加入 20  $\mu\text{L}$  正亮氨酸内标溶液(1 mg/mL), 100  $\mu\text{L}$  三乙胺乙腈溶液(1.4 mL 三乙胺与 8.6 mL 乙腈), 100  $\mu\text{L}$  异硫氰酸苯酯乙腈溶液(20  $\mu\text{L}$  异硫氰酸苯酯与 2 mL 乙腈), 室温放置 1 h, 加入 400  $\mu\text{L}$  正己烷, 取下层溶液过膜。使用 Waters 2695 串联 Waters 紫外检测器。具体条件如下, 色谱柱为 Venusil-AA 氨基酸分析专用柱(100 A, 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、检测波长 254 nm、柱温  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、流动相 A(15.2 g 无水醋酸钠, 1850 mL 水、pH 6.5、乙腈 140 mL)与流动相 B[80%(*V:V*)乙腈溶液]、进样量 2  $\mu\text{L}$ 、流速: 1 mL/min, 梯度洗脱(0~14 min, 20% B; 14~33 min, 34% B; 33.02~41 min, 100% B; 41.02~49 min, 0% B)。

### 2.2.6 晚期糖基化末端终产物 AGEs(CML 及 CEL)含量的测定

准确称量 5 mg 蛋白当量的样品, 脱脂后加入 1 mL 硼

酸钠溶液和 1.5 mL 的硼酸盐缓冲液 (0.2 mol/L, pH 9.2),  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜还原。加入 2.5 mL 的浓盐酸(12 mol/L), 氮气保护, 在  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下水解 24 h, 水解液过滤定容。300  $\mu\text{L}$  样液吹干后加入 150  $\mu\text{L}$  d4-CML 和 d4-CEL 混合内标(1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), 加入 3 mL 超纯水后过固相萃取柱。固相萃取柱(SPE, Oasis MCX cartridge, 60 mg, 3 cc, 60  $\mu\text{m}$ )条件如下: 活化分别使用 3 mL 的甲醇和 0.1 mol/L 的盐酸, 上样后使用 0.1 mol/L 的盐酸和 3 mL 的甲醇对样品进行淋洗, 使用 6 mL 氯化甲醇(95:5, *V:V*)洗脱。氮吹吹干后使用 300  $\mu\text{L}$  甲醇进行复溶, 0.22  $\mu\text{m}$  的纤维薄膜过滤, 准备进样分析。

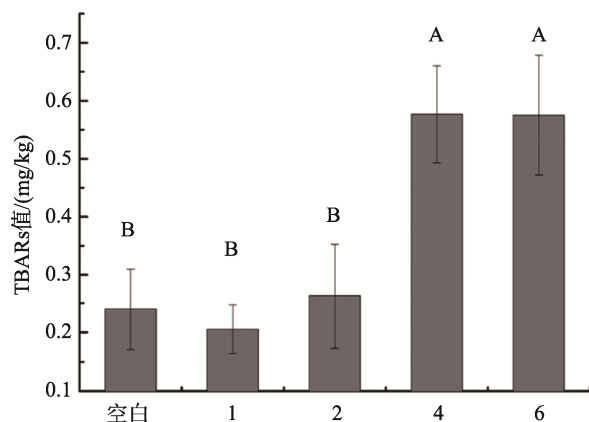
HPLC 条件: 色谱柱为 X-Bridge  $\text{C}_{18}$ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ), 柱温为  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.1% 甲酸水溶液, 流速为 0.3 mL/min, 梯度洗脱条件: 0 min, 5% A; 5 min, 60% A; 7 min, 100% A; 9 min, 100% A; 10 min, 5% A; 运行时间: 20 min。串联质谱条件: 采用多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)下的电喷雾正离子源(ESI+), 离子源温度为  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 脱溶剂温度为  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。其中 MRM 模式设置为 CML:  $m/z$  205 $\rightarrow$  $m/z$  84; CML-d4:  $m/z$  209 $\rightarrow$  $m/z$  88; CEL:  $m/z$  219 $\rightarrow$  $m/z$  84; CEL-d4:  $m/z$  223 $\rightarrow$  $m/z$  88。

## 3 结果与分析

### 3.1 反复冻融对原料肉脂肪氧化的影响

新鲜原料肉最为普遍的储存方式为冻藏, 但冻藏在储存过程中物理化学性质会发生改变, 尤其是将冻藏原料肉进行解冻后, 会损失一定汁液, 肉质构也会发生相应的改变<sup>[13]</sup>。这主要是因为原料肉中的水变成冰后体积增大, 可能形成较大的冰晶, 从而引起原料肉机械损伤、细胞的破裂及组织的破坏<sup>[14]</sup>。Martino 等<sup>[15]</sup>、Molina 等<sup>[16]</sup>指出冷冻过程中冰晶的形成会导致细胞膜的破裂, 使细胞内相关促进脂质氧化物质释放, 加速了脂质的氧化。而肉类的脂质氧化与风味、色泽、气味、品质和营养价值的恶化密切相关。

反复冻融后原料肉的 TBARs 值如图 1 所示, 总冻融次数为 6 次, 分别为新鲜原料肉(control)、1 次冻融(1 cycle)、2 次冻融(2 cycles)、4 次冻融(4 cycles)及 6 次冻融(6 cycles)。从图 1 中可以看出 6 次冻融后原料肉的 TBARs 值与新鲜肉相比发生了显著的提高( $P < 0.05$ )。前 2 次冻融过程中 TBARs 值变化并不明显( $P > 0.05$ ), 冻融 4 次后显著升高至 0.57 mg/kg( $P < 0.05$ ), 较第 2 次冻融提高了 50%, 这也与 Chen 等<sup>[17]</sup>、Ali 等<sup>[8]</sup>的研究结果一致, 其研究表明在 0~3 次反复冻融过程中牛肉及鸡胸肉的 TBARs 值增长不明显, 但 4~6 次 TBARs 值显著升高, 牛肉 TBARs 值在第 7 次冻融后升高至 0.51 mg/kg, 鸡胸肉 TBARs 值也升至 0.50 mg/kg。这说明在冻融过程中, 冻融 2 次对实验中原料肉脂肪氧化的影响不显著, 4 次冻融之后, 原料肉发生显著的氧化反应( $P < 0.05$ )。



注:不同字母(A-B)代表显著性差异(P<0.05)。

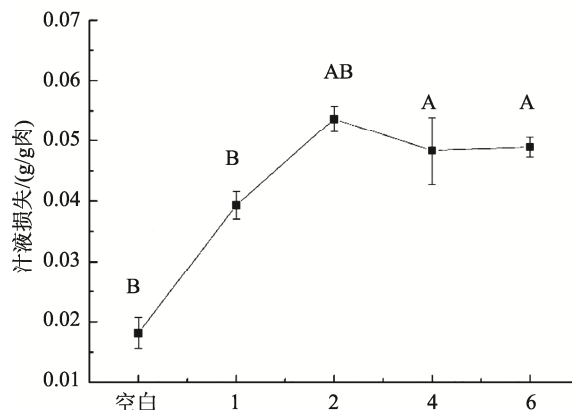
图 1 反复冻融下生肉的 TBARs 值(n=3)

Fig. 1 TBARs value of raw patties through repeated freeze-thaw cycles(n=3)

同时,反复冻融后的鸡胸肉中脂肪酸含量发生了显著的变化。本文中检测出 15 种脂肪酸,按照含量由高至低排序为油酸、亚油酸、棕榈酸、硬脂酸、棕榈一烯酸、花生四烯酸、亚麻酸、肉豆蔻酸、花生二烯酸、花生五烯酸、花生一烯酸、肉豆蔻一烯酸、花生三烯酸、二十二碳六烯酸 DHA、月桂酸。除肉豆蔻一烯酸、棕榈一烯酸、花生四烯酸、花生五烯酸以外,其余脂肪酸均随冻融次数增加发生显著变化,均在第二次冻融后含量降低。这有可能是因为脂肪酸发生了氧化,双键断裂导致含量降低。总体上,饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸总量也在降低,于第 5 次冻融后显著降低,分别下降 42.58%、51.49%及 55.12%。威军等<sup>[18]</sup>研究指出反复冻融过程中脂肪酸变化涉及磷脂、甘油三酯的水解及游离脂肪酸的氧化,指出在 0~5 次冻融过程中脂类以氧化作用为主,5~10 次冻融过程中以水解及氧化为主。这与章杰等<sup>[19]</sup>研究结果一致,一经冻融原料肉中脂肪酸就会发生一定程度的氧化,饱和及不饱和脂肪酸含量降低,也会影响原料肉风味及食用价值。

随着冻融次数的增加,原料肉的汁液损失在 4 次冻融后发生显著变化(图 2),水分的流失导致细胞中脂肪酶、磷脂酶及过氧化物酶等活性增大,使脂肪氧化加快,生成大量丙二醛(MDA)为主体的醛类物质。这也与图 1 结果较为一致,第 4 次冻融后 TBARs 值提高,第 6 次冻融后总脂肪酸含量最低(表 1)。脂肪氧化途径主要由自氧化的自由基自催化进行,氢过氧化物为脂肪氧化初始反应产物,性质极

其不稳定、易断裂产生醛类,如戊醛、己醛、4-羟基壬醛和丙二醛(MDA)<sup>[20]</sup>。其中 GO 及 MGO 等是 AGEs 的重要的前体反应物,会与氨基酸残基发生反应,生成稳定且不可逆的 AGEs。



注:不同字母(A-B)代表显著性差异(P<0.05)。

图 2 反复冻融下生肉的汁液损失(n=3)

Fig. 2 Juice loss of raw patties through repeated freeze-thaw cycles(n=3)

### 3.2 反复冻融对原料肉中氨基酸组成变动及 AGEs 生成影响

原料肉中氨基酸的含量直接影响肉制品的品质及营养价值。经反复冻融的原料肉氨基酸含量发生了显著变化,其中游离氨基酸含量的变化可能是由于反复冻融过程中蛋白质的水解,或者汁液会带离部分氨基酸。表 2 为不同冻融次数下原料肉中游离氨基酸含量,原料肉中共检测出 16 种游离氨基酸。游离 Asp、Glu、Ser、Thr、Phe 含量不随冻融次数发生改变,其余 11 种游离氨基酸均随冻融次数的增加而发生一定程度的增加。CML、CEL 的重要前体为赖氨酸 Lys,游离赖氨酸的含量随冻融次数的增加显著提高,于第 4 次显著增加达到了(23.43±0.82)mg/kg。表 3 中结果表明,原料肉中总氨基酸含量均随冻融次数的增加而降低,这可能与反复冻融后部分氨基酸生成其他物质有关。其中赖氨酸的含量在第 1 次冻融后含量有所降低,但在第 2 次冻融后显著降低,含量降低至(606.18±68.39) mg/kg,之后均未发生变化。Ali 等<sup>[8]</sup>研究指出反复冻融后肌原纤维蛋白发生了降解,同时肌动蛋白被切割成较小的肽,或通过非二硫代共价键交联形成高分子量的聚合物。这会导致游离氨基酸含量的增加,促进氨基酸为前体的多种物质的生成。

表 1 不同冻融次数下原料肉脂肪酸变化(n=3)

Table 1 The content of fatty acid in raw patties through repeated freeze-thaw cycles (n=3)

脂肪酸名称(单位/%)	空白	1	2	4	6
月桂酸(lauric acid, C12:0)	0.04±0.02 <sup>a</sup>	0.02±0.01 <sup>b</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>	0.03±0.02 <sup>ab</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>
肉豆蔻酸(myristic acid, C14:0)	0.66±0.19 <sup>a</sup>	0.35±0.13 <sup>ab</sup>	0.28±0.07 <sup>b</sup>	0.62±0.19 <sup>a</sup>	0.25±0.02 <sup>b</sup>
肉豆蔻一烯酸(myristoleic acid, C14:1)	0.38±0.50 <sup>a</sup>	0.06±0.03 <sup>a</sup>	0.05±0.01 <sup>a</sup>	0.08±0.50 <sup>a</sup>	0.04±0.01 <sup>a</sup>

续表 1

脂肪酸名称(单位/%)	空白	1	2	4	6
棕榈酸(palmitic acid, C16:0)	20.89±7.26 <sup>a</sup>	15.91±4.06 <sup>ab</sup>	13.14±1.52 <sup>b</sup>	20.08±7.26 <sup>ab</sup>	12.74±1.23 <sup>b</sup>
棕榈一烯酸(palmitoleic, C16:1)	3.80±1.48 <sup>a</sup>	3.06±1.23 <sup>a</sup>	2.18±0.48 <sup>a</sup>	3.88±1.48 <sup>a</sup>	2.06±0.31 <sup>a</sup>
硬脂酸(stearic acid, C18:0)	10.25±3.93 <sup>a</sup>	6.23±1.77 <sup>ab</sup>	5.61±0.53 <sup>ab</sup>	9.56±3.93 <sup>ab</sup>	5.27±0.29 <sup>b</sup>
油酸(oleic acid, C18:1, cis-9)	38.93±16.88 <sup>a</sup>	25.36±8.29 <sup>ab</sup>	28.28±7.50 <sup>ab</sup>	33.13±16.88 <sup>ab</sup>	12.93±4.32 <sup>b</sup>
亚油酸(linoleic acid, C18:2, cis-9,12)	26.31±10.02 <sup>a</sup>	21.25±6.87 <sup>a</sup>	16.56±1.35 <sup>a</sup>	27.06±10.02 <sup>a</sup>	10.53±1.62 <sup>b</sup>
亚麻酸(linolenic acid, C18:3, cis-9,12,15)	1.94±0.80 <sup>ab</sup>	1.79±0.73 <sup>ab</sup>	1.21±0.13 <sup>b</sup>	2.49±0.80 <sup>a</sup>	1.09±0.12 <sup>b</sup>
花生一烯酸(eicosenoic acid, C20:1, cis11)	0.43±0.28 <sup>a</sup>	0.13±0.05 <sup>b</sup>	0.11±0.02 <sup>b</sup>	0.27±0.28 <sup>ab</sup>	0.09±0.01 <sup>b</sup>
花生二烯酸(eicosadienoic acid, C20:2)	0.54±0.27 <sup>a</sup>	0.25±0.09 <sup>b</sup>	0.24±0.06 <sup>b</sup>	0.39±0.27 <sup>ab</sup>	0.22±0.02 <sup>b</sup>
花生三烯酸(bishomo-r-linolenic acid, C20:3)	0.34±0.07 <sup>ab</sup>	0.29±0.08 <sup>ab</sup>	0.28±0.06 <sup>ab</sup>	0.38±0.07 <sup>a</sup>	0.24±0.01 <sup>b</sup>
花生四烯酸(arachidonic acid, C20:4)	2.25±0.46 <sup>a</sup>	1.74±0.48 <sup>a</sup>	1.78±0.43 <sup>a</sup>	2.10±0.46 <sup>a</sup>	1.62±0.11 <sup>a</sup>
花生五烯酸 EPA( eicosapentaenoic acid, C20:5)	0.52±0.15 <sup>a</sup>	0.39±0.14 <sup>a</sup>	0.40±0.13 <sup>a</sup>	0.49±0.15 <sup>a</sup>	0.60±0.06 <sup>a</sup>
二十二碳六烯酸 DHA(docosahexaenoic acid, C22:6)	0.21±0.03 <sup>a</sup>	0.13±0.04 <sup>b</sup>	0.13±0.05 <sup>b</sup>	0.15±0.03 <sup>ab</sup>	0.11±0.01 <sup>b</sup>
饱和脂肪酸	31.84±0.03 <sup>a</sup>	22.52±0.03 <sup>abc</sup>	19.05±0.04 <sup>bc</sup>	30.29±0.04 <sup>ab</sup>	18.28±0.01 <sup>b</sup>
单不饱和脂肪酸	43.54±9.02 <sup>a</sup>	28.62±4.87 <sup>ab</sup>	30.28±1.38 <sup>ab</sup>	37.35±5.80 <sup>ab</sup>	21.12±1.19 <sup>b</sup>
多不饱和脂肪酸	32.11±11.80 <sup>a</sup>	25.84±8.43 <sup>ab</sup>	20.60±2.21 <sup>ab</sup>	33.06±11.80 <sup>ab</sup>	14.41±3.40 <sup>b</sup>

注: 同一行不同字母(a-b)代表显著性差异( $P<0.05$ )。

表 2 不同冻融次数下原料肉中游离氨基酸含量(以干基计)( $n=3$ )  
Table 2 The free amino acid in raw patties through repeated freeze-thaw cycles (in dry basis)( $n=3$ )

氨基酸名称(单位/(mg/kg))	空白	1	2	4	6
Asp	21.92±1.57 <sup>c</sup>	17.88±2.48 <sup>c</sup>	25.86±6.47 <sup>bc</sup>	31.45±3.74 <sup>b</sup>	49.61±6.61 <sup>a</sup>
Glu	0.33±0.01 <sup>b</sup>	0.35±0.02 <sup>b</sup>	0.39±0.04 <sup>b</sup>	0.37±0.02 <sup>b</sup>	0.53±0.07 <sup>a</sup>
Ser	22.14±9.25 <sup>a</sup>	23.67±2.59 <sup>a</sup>	29.46±5.48 <sup>a</sup>	29.34±2.90 <sup>a</sup>	32.55±3.89 <sup>a</sup>
Gly	13.45±4.59 <sup>a</sup>	14.53±0.65 <sup>a</sup>	17.01±3.92 <sup>a</sup>	16.28±0.81 <sup>a</sup>	15.65±1.57 <sup>a</sup>
His	64.24±57.77 <sup>b</sup>	84.88±2.05 <sup>ab</sup>	109.74±0.41 <sup>a</sup>	91.8±1.76 <sup>ab</sup>	94.67±12.86 <sup>ab</sup>
Arg	139.32±163.07 <sup>b</sup>	313.3±22.82 <sup>a</sup>	294.48±51.6 <sup>a</sup>	281.81±64.19 <sup>ab</sup>	338.15±19.3 <sup>a</sup>
Thr	19.79±6.57 <sup>b</sup>	19.52±1.6 <sup>b</sup>	22.28±1.24 <sup>b</sup>	23.99±0.77 <sup>ab</sup>	27.87±2.42 <sup>ab</sup>
Pro	436.07±25.27 <sup>a</sup>	409.12±32.75 <sup>a</sup>	426.34±41.52 <sup>a</sup>	404.61±43.12 <sup>a</sup>	423.88±24.79 <sup>a</sup>
Ala	14.95±3.48 <sup>a</sup>	16.24±1.29 <sup>a</sup>	17.47±2.23 <sup>a</sup>	14.55±0.55 <sup>a</sup>	18.15±1.19 <sup>a</sup>
Tyr	15.52±4.48 <sup>b</sup>	15.39±1.08 <sup>b</sup>	20.11±4.55 <sup>ab</sup>	20.73±0.49 <sup>ab</sup>	24.61±1.09 <sup>a</sup>
Val	14.87±4.87 <sup>b</sup>	15.95±1.73 <sup>b</sup>	20.38±4.15 <sup>ab</sup>	21.12±0.37 <sup>ab</sup>	24.86±1.71 <sup>a</sup>
Met	9.69±2.68 <sup>b</sup>	9.68±1.13 <sup>b</sup>	11.96±2.92 <sup>b</sup>	18.51±4.08 <sup>a</sup>	17.89±0.61 <sup>a</sup>
Cys	nd	nd	nd	nd	nd
Ile	22.41±7.33 <sup>b</sup>	23.28±2.62 <sup>b</sup>	30.25±5.81 <sup>ab</sup>	32.96±1.09 <sup>a</sup>	38.14±2.04 <sup>a</sup>
Phe	9.36±2.89 <sup>b</sup>	9.45±1.02 <sup>b</sup>	12.22±2.22 <sup>ab</sup>	13.3±0.66 <sup>a</sup>	15.31±0.62 <sup>a</sup>
Lys	16.88±6.12 <sup>ab</sup>	13.26±1.93 <sup>b</sup>	20.92±7.17 <sup>ab</sup>	23.43±0.82 <sup>a</sup>	25.37±3.49 <sup>a</sup>

注: 同一行不同字母(a-b)代表显著性差异( $P<0.05$ )。

表 3 不同冻融次数下原料肉中总游离氨基酸含量(以干基计)( $n=3$ )  
Table 3 The total amino acid in raw patties through repeated freeze-thaw cycles (in dry basis)( $n=3$ )

氨基酸名称(单位/(mg/kg))	空白	1	2	4	6
Asp	800.70±111.11 <sup>a</sup>	900.83±87.03 <sup>a</sup>	879.08±92.34 <sup>a</sup>	806.27±109.66 <sup>a</sup>	813.24±104.48 <sup>a</sup>
Glu	8.67±1.31 <sup>a</sup>	9.95±0.89 <sup>a</sup>	9.90±0.93 <sup>a</sup>	9.38±0.58 <sup>a</sup>	8.87±1.14 <sup>a</sup>
Ser	262.09±44.17 <sup>a</sup>	300.01±26.11 <sup>a</sup>	299.08±34.57 <sup>a</sup>	288.37±21.29 <sup>a</sup>	284.28±41.92 <sup>a</sup>
Gly	1411.58±170.47 <sup>b</sup>	1640.65±138.58 <sup>a</sup>	1533.9±123.98 <sup>ab</sup>	1415.74±101.65 <sup>b</sup>	1494.14±128.41 <sup>ab</sup>
His	968.52±317.7 <sup>a</sup>	816.13±86.7 <sup>ab</sup>	805.71±70.08 <sup>ab</sup>	753.15±73.24 <sup>b</sup>	812.01±79.72 <sup>ab</sup>
Arg	804.42±149.75 <sup>b</sup>	983.04±92.5 <sup>a</sup>	947.42±90.85 <sup>a</sup>	881.66±53.95 <sup>ab</sup>	872.85±104.75 <sup>ab</sup>
Thr	1979.25±315.94 <sup>a</sup>	2027.61±151.05 <sup>a</sup>	1987.73±160.39 <sup>a</sup>	1900.64±230.20 <sup>a</sup>	1983.04±376.56 <sup>a</sup>
Pro	816.71±118.62 <sup>b</sup>	946.49±90.43 <sup>a</sup>	909.41±96.45 <sup>ab</sup>	853.76±66.64 <sup>ab</sup>	870.10±88.28 <sup>ab</sup>
Ala	5695.26±942.97 <sup>ab</sup>	6416.22±981.47 <sup>a</sup>	5444.75±1226.93 <sup>ab</sup>	4626.27±1230.42 <sup>b</sup>	6031.34±1122.67 <sup>ab</sup>
Tyr	654.22±150.38 <sup>ab</sup>	759.18±80.98 <sup>a</sup>	671.52±75.23 <sup>ab</sup>	601.22±37.17 <sup>b</sup>	639.36±92.23 <sup>ab</sup>
Val	1231.11±118.3 <sup>b</sup>	1411.22±134.66 <sup>a</sup>	1301.61±145.12 <sup>ab</sup>	1193.8±130.39 <sup>b</sup>	1266.39±118.72 <sup>ab</sup>
Met	586.11±58.81 <sup>ab</sup>	650.03±71.64 <sup>a</sup>	573.24±79.82 <sup>ab</sup>	520.41±51.20 <sup>b</sup>	575.7±60.46 <sup>ab</sup>
Cys	248.6±111.66 <sup>a</sup>	168.04±8.40 <sup>b</sup>	167.02±14.87 <sup>b</sup>	167.61±18.03 <sup>b</sup>	188.39±44.98 <sup>ab</sup>
Leu	1495.08±138.78 <sup>ab</sup>	1634.5±166.8 <sup>a</sup>	1489.12±175.98 <sup>ab</sup>	1365.08±177.45 <sup>b</sup>	1478.18±147.91 <sup>ab</sup>
Ile	2433.59±241.73 <sup>ab</sup>	2720.13±289.08 <sup>a</sup>	2461.76±314.42 <sup>ab</sup>	2235.97±295.93 <sup>b</sup>	2479.94±250.85 <sup>ab</sup>
Phe	1378.16±147.11 <sup>a</sup>	1335.28±238.15 <sup>a</sup>	1311.43±185.66 <sup>a</sup>	1187.97±178.72 <sup>a</sup>	1338.92±145.3 <sup>a</sup>
Lys	748.82±103.87 <sup>a</sup>	691.56±104.59 <sup>ab</sup>	606.18±68.39 <sup>b</sup>	600.92±80.50 <sup>b</sup>	570.67±169.93 <sup>b</sup>

注: 同一行不同字母(a-b)代表显著性差异( $P<0.05$ )。

从表 4 中可以看出, 原料肉中 CEL 与 CML 含量均随冻融次数的改变发生相应的变化。新鲜的原料肉中 CEL 的含量最低, (85.03±20.53)  $\mu\text{g/g}$ , 一次冻融后含量增加了一倍, 发生显著性的提高, 第 2 次冻融后含量有一定程度上的降低, 第 4 次冻融后含量未发生显著变化趋于平稳。同时, CML 的含量在前两次冻融过程中未发生显著变化, 在第 4 次冻融时发生了显著降低。AGEs 的种类很多, 吡咯素、乙二醛-赖氨酸二聚物、丙酮醛-赖氨酸二聚物和乙二醛-赖氨酸-酰胺等, 它们的生成途径相互竞争。中间体 GO、MGO 可以与赖氨酸、精氨酸以及半胱氨酸都反应形成各种 AGES, CML 生成量下降, 未必是 AGEs 总量下降。同时, 脂质氧化会促进形成  $\alpha$  醛酮化合物, 可能会促进其他 AGEs 形成。Niu 等<sup>[11]</sup>研究了鱼肉的新鲜程度对原料肉加工前后 AGEs 含量的变化, 在 0 °C 贮藏不同时间的鲶鱼(贮藏 0~14 d 或 0~21 d)或草鱼肌肉(贮藏 0~21 d)的 AGEs 含量均无显著性差异, 但在贮藏 21 d 的草鱼肌肉中, 蛋白质结合 CML 的平均含量比新鲜的鱼肉增加了 19%。新鲜原料肉中 AGEs 主要来源为体内膳食性 AGEs 的积累, 同时在生理条件下也会产生 AGEs 的生成。冻融一次后, 原料肉

中脂肪酸发生了氧化反应, 生成的自由基及中间体醛类, 会促进 AGEs 生成。TBARs 测定可以一定程度上反应脂肪氧化产生的中间体醛类, 如 GO 和 MGO(CML 和 CEL 的前体物质), 脂肪的氧化也是 AGEs 形成的重要途径。在脂肪氧化途径中, 赖氨酸残基和一些二羰基化合物(例如 GO 和 MGO)反应后, 同样也会导致 CML 和 CEL 的产生。脂质过氧化过程中产生的乙二醛与赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基直接反应, 可通过脂质氧化终产物途径生成 CEL。

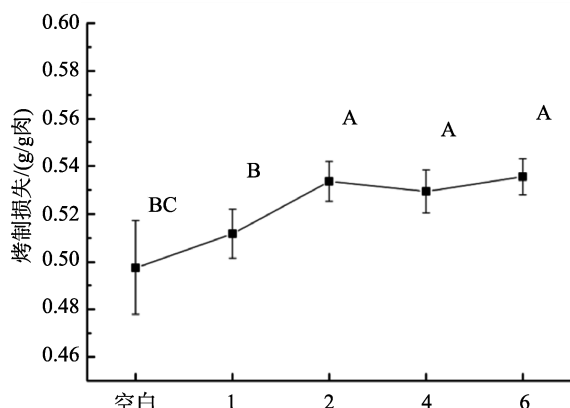
表 4 不同冻融次数下原料肉中 CEL 及 CML 的生成量( $n=3$ )  
Table 4 The content of CEL and CML in raw patties through repeated freeze-thaw cycles( $n=3$ )

	CEL/( $\mu\text{g/g}$ )	CML/( $\mu\text{g/g}$ )
空白	85.03±20.53 <sup>c</sup>	297.17±43.24 <sup>ab</sup>
生肉饼 (以干基计)	1	165.01±2.33 <sup>a</sup>
	2	133.43±1.96 <sup>b</sup>
	4	124.55±4.84 <sup>b</sup>
	6	127.83±5.21 <sup>b</sup>
		246.85±43.01 <sup>ab</sup>

注: 同一列不同字母(a-b)代表显著性差异( $P<0.05$ )。

### 3.3 反复冻融对热加工后肉饼中 AGEs 生成影响

加工方式是影响 AGEs 形成的重要因素, 加工温度越高会产生越多的 AGEs<sup>[21]</sup>。反复冻融使原料肉蛋白质发生氧化及水解比例增加, 同时也会降低原料肉的 pH 及持水力。当热处理时, 反复冻融会导致原料肉在烤制过程中烤制损失的增加, 如图 3, 第 2 次冻融后肉饼的烤制损失发生显著性提高。表 5 为加工后肉饼中 AGEs 含量变化。加工后肉饼中 CEL 的含量随冻融次数的增加而缓慢增加, 于第 6 次冻融后含量最多达到(133.26±7.16) μg/g, 较新鲜原料肉增加约 14.8%。CML 的含量未随冻融次数的增加发生显著性变化, 但数值在第 6 次冻融后达到最高(409.58±118.61) μg/g, 较新鲜原料肉增加约 43.7%。尽管统计显著性不够, 但是表现呈现逐渐上升趋势。原料肉中脂肪酸氧化是显著的, 脂肪酸氧化是促进 AGEs 形成, 但 AGEs 形成途径复杂, 脂肪氧化促进只是其中一种影响因素。Niu 等<sup>[22]</sup>研究结果表明加热对肉制品中游离 AGEs 的含量影响较小, 但 0 °C 储存后结合态的 AGEs 含量变化随储存时间的增加而相应增长, 增长倍数为 7%~200%不等。反复冻融会导致原料肉中蛋白质分解和脂质氧化, 从而改变原料肉的化学性质, 导致更多活性游离氨基的暴露或导致反应中间产物的形成, 从而加速 CML 和 CEL 在热处理过程中的形成。



注: 不同字母(A-B)代表显著性差异( $P<0.05$ )。

图 3 反复冻融后烤肉饼的烤制损失( $n=3$ )

Fig. 3 The roast loss of roast patties through repeated freeze-thaw cycles ( $n=3$ )

表 5 不同冻融次数下烤肉饼中 CEL 及 CML 的生成量( $n=3$ )  
Table 5 The content of CEL and CML in roast patties through repeated freeze-thaw cycles ( $n=3$ )

	CEL/(μg/g)	CML/(μg/g)	
空白	116.00 ± 18.07 <sup>ab</sup>	285.00 ± 67.01 <sup>a</sup>	
烤肉饼 (以干基计)	1	104.64 ± 4.78 <sup>b</sup>	276.85 ± 6.29 <sup>a</sup>
	2	125.92 ± 11.25 <sup>ab</sup>	366.64 ± 87.62 <sup>a</sup>
	4	123.98 ± 10.64 <sup>ab</sup>	292.69 ± 31.92 <sup>a</sup>
	6	133.26 ± 7.16 <sup>a</sup>	409.58 ± 118.61 <sup>a</sup>

注: 同一列不同字母(a-b)代表显著性差异( $P<0.05$ )。

## 4 结 论

冻融会导致脂肪严重氧化, 游离氨基酸增加, 赖氨酸和精氨酸等晚期糖基化末端产物的底物损失严重, 原料肉中 CML 和 CEL 随着冻融次数增加变动显著, 说明生物反应途径以及氧化反应同步影响着原料肉中 AGEs 的积累; 加工后肉饼中的 CML 和 CEL 含量从统计学角度总量增加不显著, 但表现差异很大, 6 次循环后的产物加工后肉饼中 CML 较新鲜原料肉增加约 43.7%。上述结果说明冻藏过程中, 原料肉的反复冻融会导致脂肪发生氧化, AGEs(CML 及 CEL)的累积, 同时会影响热加工后肉制品的品质以及营养和健康水平。

### 参考文献

- [1] Kosmopoulos M, Drekolias D, Zavras P, *et al.* Impact of advanced glycation end products (AGEs) signaling in coronary artery disease [J]. *Bba-Mol Basis Dis*, 2019, 1865(3): 611–619.
- [2] Nowotny K, Schroter D, Schreiner M, *et al.* Dietary advanced glycation end products and their relevance for human health [J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 47(2): 55–66.
- [3] Busch M, Franke S, Wolf G. The advanced glycation end products, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(17): 6.
- [4] Wei Q, Liu T, Sun DW. Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2018, 82: 32–45.
- [5] Coombs CE, Holman BW, Friend MA, *et al.* Long-term red meat preservation using chilled and frozen storage combinations: A review [J]. *Meat Sci*, 2017, 125: 84–94.
- [6] Jeong JY, Kim GD, Yang HS, *et al.* Effect of freeze-thaw cycles on physicochemical properties and color stability of beef semimembranosus muscle [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(10): 3222–3228.
- [7] Zhang M, Li F, Diao X, *et al.* Moisture migration microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles [J]. *Meat Sci*, 2017, 133(7): 10–18.
- [8] Ali S, Zhang W, Rajput N, *et al.* Effect of multiple freeze-thaw cycles on the quality of chicken breast meat [J]. *Food Chem*, 2015, 173(8): 808–814.
- [9] Qi J, Li C, Chen Y, *et al.* Changes in meat quality of ovine longissimus dorsi muscle in response to repeated freeze and thaw [J]. *Meat Sci*, 2012, 92(4): 619–626.
- [10] Mottram DS, Elmore JS. The interaction of lipid-derived aldehydes with the maillard reaction in meat systems [J]. *Maillard React Food Med*, 2005, (4): 198–203.
- [11] Niu L, Sun X, Tang J, *et al.* Formation of advanced glycation end-products in fish muscle during heating: Relationship with fish freshness [J]. *J Food Compos Anal*, 2017, 63(5): 133–138.
- [12] Yua LG, Hea ZY, Zenga M, *et al.* Effect of irradiation on Nε-carboxymethyl-lysine and Nε-carboxyethyl-lysine formation in cooked meat products during storage [J]. *Radiat Phys Chem*, 2016, 120: 73–80.
- [13] Leygonie C, Britz TJ, Hoffman LC. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review [J]. *Meat Sci*, 2012, 91(2): 93–98.
- [14] Chen TH, Zhu YP, Han MY, *et al.* Classification of chicken muscle with

- different freeze-thaw cycles using impedance and physicochemical properties [J]. *J Food Eng*, 2017, 196(3): 94–100.
- [15] Martino MN, Zaritzky, NE. Ice crystal size modifications during frozen beef storage [J]. *J Food Sci*, 1988, 53(6): 1631–1637.
- [16] Molina AD, Otero L, Martino MN, *et al*. Ice VI freezing of meat: Supercooling and ultrastructural studies [J]. *Meat Sci*, 2004, 66(3): 709–718.
- [17] Chen Q, Xie Y, Xi J. Characterization of lipid oxidation process of beef during repeated freeze-thaw by electron spin resonance technology and Raman spectroscopy [J]. *Food Chem*, 2018, 243(7): 58–64.
- [18] 戚军, 高菲菲, 李春保, 等. 低场 NMR 研究冻融过程中羊肉持水力的变化[J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(3): 617–622.
- Qi J, Gao FF, Li CB, *et al*. Water holding capacity of mutton during freeze-thaw cycles by a low field nuclear magnetic resonance [J]. *J Jiangsu Agric Sci*, 2010, 26(3): 617–622.
- [19] 章杰, 何航, 熊子标, 等. 烹饪方式对猪肉品质及营养成分的影响[J]. *食品与机械*, 2018, 34(6): 21–27.
- Zhang J, He H, Xiong ZB, *et al*. Effect of cooking methods on the quality and nutritive contents of pork [J]. *Food Mach*, 2018, 34(6): 21–27.
- [20] Ahn DU, Olson DG, Jo C, *et al*. Effect of muscle type, packaging, and irradiation on lipid oxidation, volatile production, and color in raw pork patties [J]. *Meat Sci*, 1998, 49(1): 27–39.
- [21] Hu L, Ren S, Shen Q, *et al*. Proteomic study of the effect of different cooking methods on protein oxidation in fish fillets [J]. *Rsc Adv*, 2017, 7(44): 27496–27505.
- [22] Niu L, Sun X, Tang J, *et al*. Free and proteinbound N $\epsilon$ -carboxymethyllysine and N $\epsilon$ -carboxyethyllysine in fish muscle: biological variation and effects of heat treatments [J]. *J Food Compos Anal*, 2017, 77(57): 56–63.

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



张 昆, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与组分变化。

E-mail: mail\_zhangkun@126.com



陈 洁, 教授, 主要研究方向为食品加工与组分变化。

E-mail: chenjie@jiangnan.edu.cn