

牛肉宰后嫩化机制的研究

黄明, 周光宏, 徐幸莲, 王俊

(农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 南京农业大学食品科技学院, 南京 210095)

摘要: 为了阐明牛肉的成熟机理, 本试验模拟尸僵后牛肉的内在环境和成熟温度, 将纯化后的钙激活酶 I (μ -Calpain)、内源性钙激活酶 I 专一抑制剂 (Calpastatin)、肌原纤维和钙激活酶 I 外源性抑制剂抑亮酶肽 (Leupeptin) 用于 6 个不同的处理组合, 反应不同时间后, 分别做变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹分析 (Western-blotting)。结果表明, Ca^{2+} (100 μM) 对肌原纤维没有降解作用, 而在含 Ca^{2+} (100 μM) 的反应体系中, μ -Calpain 对肌间线蛋白 (Desmin) 和肌钙蛋白 T (Troponin-T) 都有明显的降解作用, 且降解产物和宰后牛肉自然成熟条件下的降解产物类似; Calpastatin 不能完全抑制 μ -Calpain 的活性; 离体反应和自然成熟的牛肉中的肌动蛋白都没有发生变化。以上结论表明 Ca^{2+} 很可能是通过激活 μ -Calpain 而间接发挥对肌原纤维的降解作用, 而溶酶体组织蛋白酶在牛肉成熟的早期对嫩度的改善贡献不大。

关键词: 牛肉; 嫩化; 机制; 钙离子; 钙激活酶 I

中图分类号: TS251.5⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2004)01-0198-05

0 引言

大量的试验调查表明, 牛肉嫩度是决定牛肉食用品质最重要的指标, 在一定程度上, 牛肉的嫩度决定着牛肉的价格^[1,2], 所以改善和提高牛肉的嫩度是提高牛肉质量的基本途径。虽然结缔组织和大理石花纹和牛肉嫩度都有一定相关性, 但很多试验证实它们不是影响牛肉嫩度的主要因素^[3,4]。而宰后成熟过程中, 肌细胞骨架蛋白的降解则对牛肉嫩度的提高起着主导作用^[5]。所以围绕宰后牛肉成熟过程中骨架蛋白的变化, 很多学者进行了大量研究, 并提出了各自的理论。Koochmarai 和 Dransfield 等人^[6]认为骨架蛋白的降解主要是 μ -Calpain 的作用; Takahashi Kouri 等人^[7]则认为是单独的 Ca^{2+} 作用; Calkins 等^[8]则认为溶酶体组织蛋白酶在牛肉成熟过程中也发挥着重要作用; 而 Lamare 等^[9]对宰后牛肉中蛋白酶体的活性跟踪发现, 在生理 pH 值, 4 存放 7 d 后, 蛋白酶体仍保持较高活性, 并认为蛋白酶体在牛肉宰后成熟过程中会和其它内源蛋白酶一起发挥作用。所以, 澄清牛肉嫩化机制并对嫩化速度和进程进行调控, 对最终改善牛肉产品质量, 提高肉牛产业的竞争力和经济效益具有重要的理论意义和现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂

PVDF 膜、NBT/BCIP 显色剂购自 Roche 公司; 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白购自 Promega 公

司; 电泳试剂、标准蛋白 (RPN 756) 及层析材料购自 Pharmacia 公司; 抗肌动蛋白和肌钙蛋白 T 的单克隆抗体购自 Sigma 公司; 其它化学试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器

低压层析系统: Pharmacia 生产; 匀浆器 B. BRAUN 型, 德国生产; 高速冷冻离心机: 日本日立公司生产 (SCR 20BC); 电泳仪及电泳槽: 北京六一厂生产; 半干转印仪: 上海电泳仪器厂生产; pH 计: 上海雷磁仪器厂生产 (PHS-3C 型); 脱色摇床: 南京大学实验仪器厂生产。

1.1.3 样品制备

1) 肌原纤维的制备

肌原纤维的提取和纯化采用 Huff-bnorgan 的方法^[10]。将宰后 30 min 内的黄牛背最长肌匀浆后, 采用差式离心法使肌原纤维逐步得到纯化, 并于 50% 甘油、100 mM NaCl、1 mM 叠氮钠溶液中, -30 贮存。用前用模拟尸僵后牛肉内环境的 pH 值、离子强度、氧化还原电位及主要离子构成而配置的 M SS 缓冲液 (12 mM NaCl、12.6 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、70 mM KH_2PO_4 、3.4 mM NaOH、64.2 mM KOH、11.1 mM H_2SO_4 、132 mM $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (乳酸)、100 mM Tris、1% MCE 用 1M Tris 调节 pH 值至 5.8, 4) 冲洗 3 次后制成。蛋白浓度测定采用双缩脲法。

2) μ -Calpain 和 Calpastatin 的纯化

参考 Geesink 的方法^[11]并做了适当修改。即宰后黄牛背最长肌经修整后用 3 倍体积抽提液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 10 mM EDTA, 0.05% MCE, 100 mg/L ovomucoid, 2 mM PM SF, 6 mg/L leupeptin) 离心后, 取上清液进行 0~45% 硫酸铵沉淀分级, 将沉淀用抽提液溶解透析后上 DEA E-Sephacel 离子交换柱, 将分离得到的 μ -Calpain 再分别过 Phenyl-sepharose、Butyl-sepharose、DEA E-650S、Sepharycel-300 柱, 最后得到纯化的 μ -Calpain (见图 1, 图 2)。将通过 DEA E-Sephacel 柱后得到的含 Calpastatin 活性的溶液加热 (90 , 15 min) 离心去除杂蛋白, 上清液经聚乙二醇

收稿日期: 2002-12-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30371016); 高等学校博士点专项科研基金 (2002037006); 江苏省自然科学基金 (BK2003078)

作者简介: 黄明 (1970-), 博士, 讲师, 河南商丘人, 主要从事肉品质量研究。南京卫岗 南京农业大学食品科技学院, 210095。Email: mhuang@njau.edu.cn

通讯作者: 周光宏 (1960-), 教授, 博导, 中国畜产品加工研究会会长, 地址同上。Email: ghzhou@njau.edu.cn

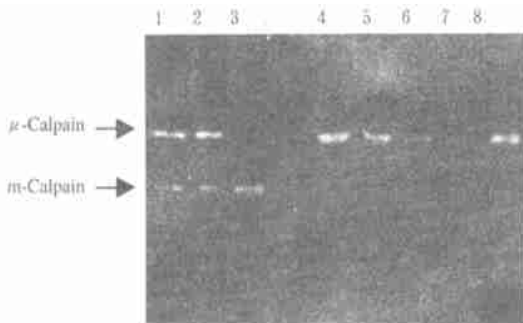
(6000) 浓缩后再过 Sepharycel-300 柱得到部分纯化的 Calpastatin。



1. 上清液 2 硫酸铵分级(P₀₋₄₅) 3 DEAE-sepharcel 4 Phenyl-Sepharose 5 Butyl-Sepharose 6 DEAE-650S 7. Sepharycel-300

图 1 μ-Calpain 的不同纯化步骤中样品的 SDS-PAGE 图谱(胶浓度 12.5%)

Fig 1 Purification of μ-Calpain from Chinese yellow cattle longissimus muscle



1. 上清液 2 硫酸铵分级(P₀₋₄₅) 3, 4 DEAE-sepharcel (3 为 m-Calpain, 4 为 μ-Calpain) 5 Phenyl-Sepharose 6 Butyl-Sepharose 7. DEAE-650S 8. Sepharycel-300

图 2 牛肉样品的活性电泳图谱

Fig 2 Casein zymography of calpains at different purification steps

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计

本试验共设计 6 个处理组合, 每个试验处理总反应体积 2.5 mL, 反应条件为 pH 5.8, 4。6 个处理组合为:

- 1) 肌原纤维(5.8 mg/mL)
- 2) 肌原纤维(5.8 mg/mL) + Ca²⁺ (100 μM)
- 3) 肌原纤维(5.8 mg/mL) + Ca²⁺ (100 μM) + 抑亮酶肽(60 μg/mL)
- 4) 肌原纤维(5.8 mg/mL) + Ca²⁺ (100 μM) + 抑亮酶肽(120 μg/mL)
- 5) 肌原纤维(5.8 mg/mL) + Ca²⁺ (100 μM) + μ-Calpain(0.15 U)
- 6) 肌原纤维(5.8 mg/mL) + Ca²⁺ (100 μM) + μ-Calpain(0.15 U) + Calpastatin(0.6 U)

1.2.2 μ-Calpain 及 Calpastatin 活性的测定

采用 Koohmarai 的方法^[12]。

1.2.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

将分别反应 1、14、30 d 的样品 400 μL 6000 × g max

离心 5 min, 沉淀用 SDS-PBS (2% SDS, 10 mM Na₃PO₄, pH 7.0) 200 μL 溶解, 然后加入 100 μL 样品缓冲液(3 mM EDTA, 3% SDS, 30% 甘油, 30 mM Tris-HCl, 0.05% 溴酚蓝, pH 8.0) 和 20 μL β-巯基乙醇。上清加入 100 μL 样品缓冲液和 10 μL β-巯基乙醇。将以上两种处理液 50 加热 20 min 后进行电泳。电泳条件: 分离胶浓度 12.5%, 浓缩胶浓度 5%, 丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺为 37.5:1, 电压 100 V, 电泳时间 4 h。电泳后的胶或用考马斯亮兰染色 1 h, 在脱色液中脱色过夜, 或用于蛋白质印迹分析。

1.2.4 蛋白质印迹分析

将电泳后的凝胶置于转移缓冲液中(20 mM Tris, 192 mM 甘氨酸, 15% 甲醇) 浸泡 20 min 后, 采用半干法将电泳凝胶中的蛋白转印到 PVDF 膜上。转印电流 200 mA, 1.5 h。转印后的 PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 溶液(30 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) 封阻过夜, 然后分别用 1:2000 稀释的抗肌动蛋白或肌钙蛋白 T 的单克隆抗体反应两小时, 在 TTBS 溶液中浸洗 3 次, 每次 5 min 后, 加入 1:4000 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 溶液中摇动 2.5 h, 经 TTBS 漂洗后在 NBT/BCIP 显色液中显色。

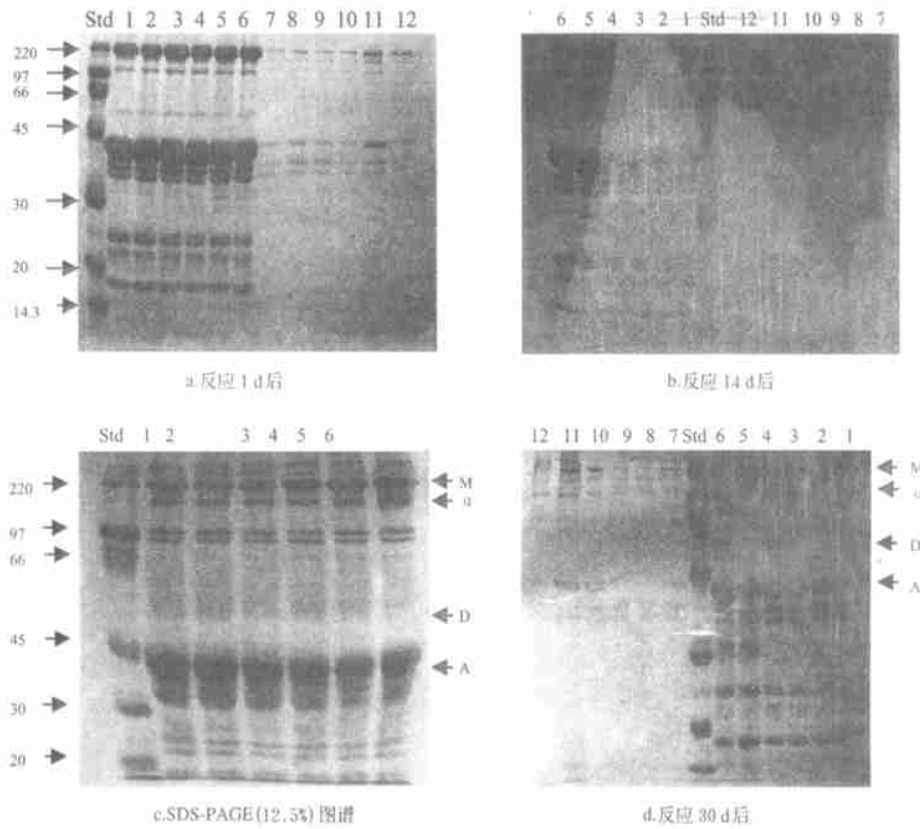
1.2.5 自然成熟条件下全肌肉蛋白电泳和肌动蛋白的印迹分析

将宰后黄牛背最长肌约 50 g 于 0~4 条件下放置不同时间后, 按照 Huff-Lonergan 的方法^[13] 做全肌肉蛋白电泳。肌动蛋白的印迹分析采用 2.2.4 的方法。

2 结果与分析

从图 3 中可以看出, 反应 1 d 后, 处理组 5 有 30 kDa 小分子产生, 肌间线蛋白也有部分降解。14 d 的样品处理组 5 有更多的 30 kDa 小片段产生, 处理 5, 6 组的肌间线蛋白都有一定程度的降解, 以处理组 5 降解最为明显。而反应 30 d 后, 处理组 5, 6 的肌间线蛋白几乎完全降解, 除处理组 5 的 30 kDa 降解产物明显外, 处理组 6 也出现 30 kDa 降解产物。处理组 1 与 2, 3, 4 组间在反应的各时间段均无差异。这说明单独的 Ca²⁺ 和抑亮酶肽对肌原纤维的降解无作用, 自然成熟条件下, 不同成熟时间的牛肉的电泳图谱也显示随着成熟时间的延长, 肌间线蛋白也发生降解, 并且有 30 kDa 亚分子片段产生。

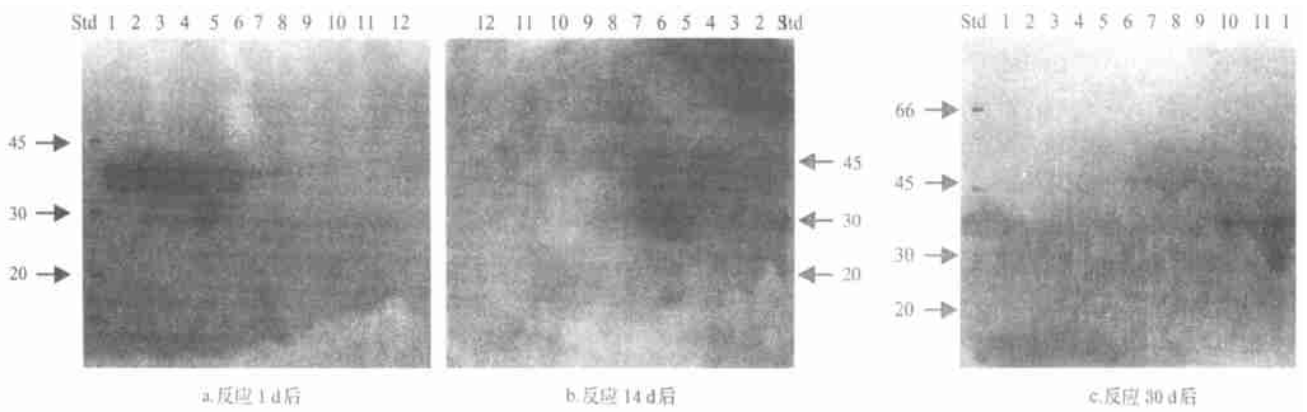
肌钙蛋白 T 的印迹分析(图 4) 表明反应 1 d 处理组 5 中的肌钙蛋白 T 就有明显降解, 而其它几个处理组肌钙蛋白 T 几乎没有变化。反应 14 d 处理组 5 肌钙蛋白 T 大部分发生降解, 处理组 6 也出现部分降解, 而反应 30 d 后处理组 5 降解更为充分, 同时有更小降解片段(10~20 kDa) 的产生, 处理组 6 的降解也较明显, 其它处理组虽然也有降解片段产生, 但它们之间没有明显差异, 说明这种降解可能是非酶因素引起。



1、2、3、4、5、6 泳道分别代表 6 个不同反应混合液沉淀样品; 7、8、9、10、11、12 分别为其上清液。D 为全肌肉蛋白的 SDS-PAGE (12.5%) 图谱。1、2、3、4、5、6 分别指成熟 0、1、3、7、14、30 d 后的样品。M: 肌球蛋白 α 肌动蛋白素 D: Desmin A: 肌动蛋白 Std: 标准蛋白泳道

图 3 6 个不同处理分别反应 1 d(A)、14 d(B)、30 d(C) 后的 SDS-PAGE (12.5%) 图谱

Fig 3 SDS-PAGE (12.5%) from six reaction mixtures, A, B and C indicate three incubation periods (1, 14, 30 days respectively)



1、2、3、4、5、6 分别代表不同的处理组合沉淀组分样品; 7、8、9、10、11、12 分别为其上清液

图 4 6 个不同处理分别反应 1 d(A)、14 d(B)、30 d(C) 后的肌钙蛋白 T 的印迹分析图谱

Fig 4 Western blotting (12.5%) of Tropomyrin-T degradation products A, B and C indicate three different incubation periods (1, 14, 30 days)

肌动蛋白的印迹分析图谱(图 5a)表明在反应的不同时间(1~ 30 d)肌动蛋白都没有发生降解变化,这说明 μ -Calpain、 Ca^{2+} 、抑亮酶肽对肌动蛋白没有作用。自

然成熟条件下不同成熟阶段(0~ 30 d)的肌动蛋白印迹图谱(图 5b)也显示肌动蛋白无降解。

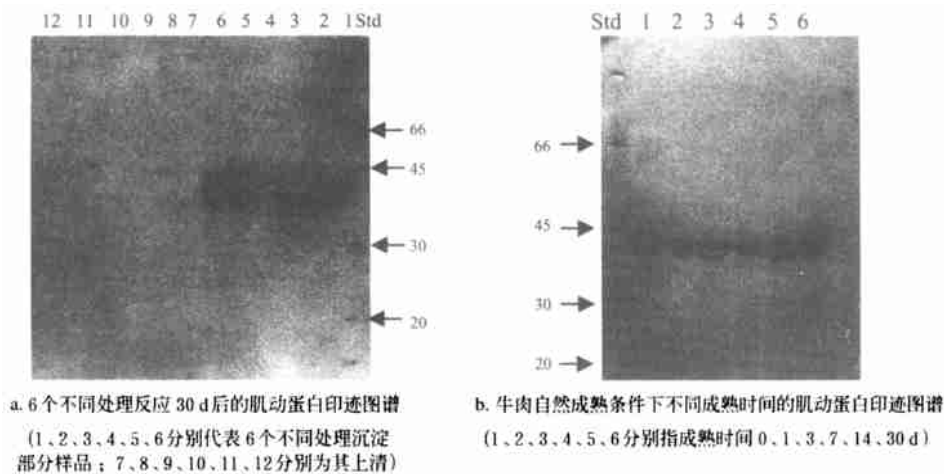


图 5 肌动蛋白印迹图谱

Fig 5 Map of western-blotting of myofibrils

4 讨 论

牛肉成熟过程中嫩度的增加主要是由肌原纤维骨架蛋白的降解造成的^[14]。很多试验证实, 肌间线蛋白和肌钙蛋白 T 的降解产物和牛肉嫩度呈很好的相关性^[15, 16]。肌钙蛋白 T 的分子量约为 35 kDa, 它能够和肌动蛋白结合。成熟过程中肌钙蛋白 T 降解成 27~ 32 kDa 的降解产物, 这些降解片段的生成速度和数量可作为牛肉嫩度改善的标志^[17, 18]。肌间线蛋白的分子量约为 212 kDa, 由四个亚基组成, 它的两端沿相邻的肌原纤维 Z 盘环绕, 属肌原纤维间的丝状蛋白。宰后牛肉成熟过程中肌间线蛋白和肌钙蛋白 T 的降解是成熟过程中肌原纤维构成蛋白变化的典型特征, 牛肉成熟过程中必然伴随着这两种蛋白的降解和嫩度的改善。本试验利用了纯化后的 μ -Calpain 并模拟牛肉尸僵后的内在环境, 结果表明单独的 Ca^{2+} 并没有引起肌间线蛋白和肌钙蛋白 T 的降解, 而添加了 μ -Calpain 的反应体系肌间线蛋白和肌钙蛋白 T 都发生了明显的降解, 且降解片段和自然成熟牛肉的降解片段相似, 这说明单独的 Ca^{2+} 在牛肉成熟的过程中贡献不大, 其作用的发挥很可能是通过激活 μ -Calpain 实现的。另外, Calpastatin 虽对 μ -Calpain 有抑制作用, 但在本试验条件下 Calpastatin 并没有完全抑制 μ -Calpain 的活性, 这可能是因为以酪蛋白为底物时测出的 μ -Calpain 活性低于以肌原纤维蛋白为底物时的活性^[19]。

溶酶体组织蛋白酶位于单层膜的溶酶体内, 它们包括 B、D、H、L、N 等多种类型, 离体试验发现溶酶体组织蛋白酶对肌钙蛋白 T、肌球蛋白、肌动蛋白都具有降解活性^[20]。Calkins 等人^[8]认为溶酶体组织蛋白酶在成熟过程中发挥着重要作用, 而肌动蛋白的印迹分析并没有发现肌动蛋白的降解, 说明溶酶体组织蛋白酶至少在牛肉成熟的早期作用不大。Goll 等人^[5]认为内源酶对牛肉成熟发挥作用必须具备三个条件: 1) 存在于肌细胞中; 2) 能够和肌原纤维骨架蛋白接触; 3) 离体试验能够模拟自然成熟条件下骨架蛋白的降解变化。溶酶体组织蛋白酶对牛肉骨架蛋白的降解是否起作用的关键很可能是

它能否从溶酶体膜中释放出来。

5 结 论

成熟是改善牛肉质量的有效途径, 成熟过程中肌浆钙离子浓度的增加可以激活 μ -Calpain, 该酶可以降解肌原纤维中的骨架蛋白, 从而引起肌纤维结构的破坏和肉嫩度的增加; 单独的钙离子可能对肉的嫩度贡献不大; 另外, 溶酶体组织蛋白酶在成熟的早期可能由于不能从溶酶体中释放而不能发挥作用。所以, 更多的工作应集中于对 μ -Calpain 的表达及活性调控研究并通过牛肉生产和加工工艺的改进, 最终提高牛肉质量。

[参 考 文 献]

- [1] Hill B D, Jones S D M, Robertson W M, et al Neural network modelling of carcass measurements to predict beef tenderness[J]. *Can Anim Sci*, 2000, 80: 311- 318
- [2] Boleman S S, Boleman S L, Miller R K, et al Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness[J]. *Anim Sci*, 1997, 75: 1521- 1524
- [3] Wulf D M, Morgan T B, Tatum J D, et al Effects of animal age, marbling score, calpastatin activity, subprimal cut, calcium injection, and degree of doneness on the palatability of steaks from limousin steers[J]. *Anim Sci*, 1996, 74: 569- 576
- [4] Wheeler T L, Cundiff L V, Koch R M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle[J]. *Anim Sci*, 1994, 72: 3145- 3151
- [5] Koo H M, Araie M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat[J]. *Meat Sci*, 1996, 43: 193- 201
- [6] Dransfield E. Meat tenderness—the μ -Calpain hypothesis[A]. 1999, 45th ICOMST[C]. 220- 228
- [7] Kouri Takahashi M. Mechanism of meat tenderization during postmortem aging: calcium theory [A]. 1999 45th ICOMST[C]. 230- 235
- [8] Calkins C R, Seideman C C. Relationships among calcium dependent protease, cathepsins B and H, meat tenderness and response of muscle to aging[J]. *Anim Sci*, 1988,

- 66: 1186- 1193
- [9] Lamare M, Taylor R G, Farout L, et al Changes in proteosome activity during postmortem aging of bovine muscle[J] Meat Sci, 2002, 61: 199- 204
- [10] Huff-Lonergan, Elisabeth, Parrish F C, Jr, et al Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle[J] Anim Sci, 1995, 73: 1064- 1073
- [11] Geesink G H, Koochmaraie M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -Calpain under postmortem conditions[J] Anim Sci, 1999, 77: 2685- 2692
- [12] Koochmaraie M. Quantification of Ca^{2+} -dependence protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography[J] Anim Sci, 1990, 68: 659- 665
- [13] Huff-Lonergan E, Tomiko Mitsunashi, Parrish F C, et al Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting comparisons of purified myofibrils and whole muscle preparations for evaluating titin and nebulin in postmortem muscle[J] Anim Sci, 1996, 74: 779- 785
- [14] 黄明, 罗欣 内源蛋白酶在肉嫩化中的作用[J] 肉类研究, 1999, 2: 9- 11- 14
- [15] Taylor R G, Geesink G H, Thompson V F, et al Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization[J] Anim Sci, 1995, 73: 1351- 1367.
- [16] Huff-Lonergan E, Tomiko Mitsunashi, Dirk D, et al Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -Calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem muscle[J] Anim Sci, 1996, 74: 993 - 1008
- [17] Geesink G H, Marek M H D, Morton J D, et al Effects of stress and high voltage electrical stimulation on tenderness of lamb M. longissimus[J] Meat Sci, 2000, 57: 265- 271.
- [18] Lonergan S M, Huff-Lonergan E Postmortem proteolysis and tenderization of top loin steaks from brangus cattle [J] Muscle Foods, 2001, 12: 121- 136
- [19] Koochmaraie M, Scholmeger J E, Dutson T R. Effect of low calcium-requiring calcium activated factor on myofibrils under varying pH and temperature conditions [J] Food Sci, 1986, 51: 28- 32 [20] Lawrie R A. Lawrie's meat science[M] England Cambridge, Woodhead Publishing House, 1998, 113- 117.

Mechanism of postmortem tenderization of beef

Huang Ming, Zhou Guanghong, Xu Xinglian, Wang Jun

(Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The objective of this study was to elucidate the mechanism of beef tenderization. Purified μ -Calpain, calpastatin, myofibrils and leupeptin were used in six different reaction mixtures. Myofibrillar SDS-PAGE and western blotting analysis were conducted after being incubated for a period of time in mixed salt solution (MSS) formulated on the basis of the post rigor condition. The results showed that desmin and troponin T were degraded by μ -Calpain into smaller fragments which were similar to the polypeptides degraded by aged beef, while calcium ($100 \mu\text{M}$) alone had no effects on myofibrils. It was also found that Calpastatin was not capable of completely inhibiting μ -Calpain activity and no degradation occurred for actin. It is concluded that cytoskeletal proteins were degraded by μ -Calpain during aging process, which might be the major reason for improving beef tenderness. Nevertheless, there was little contribution of lysosomal cathepsins to beef tenderness at early period of aging.

Key words: beef; tenderization; mechanism; calcium; μ -Calpain