

猪宰后肌肉中钙激活蛋白酶活性变化的研究

马俐珍¹, 王永辉², 范三红³

(1. 天津农学院食品科学系, 天津 300384; 2. 山西农业科学旱地农业研究中心, 太原 030006;
3. 山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要: 该文研究杂种野猪和本地白猪屠宰后, 肌肉中钙激活蛋白酶系的活性变化, 同时, 对肌肉的全蛋白提取液作 SDS-PAGE 分析。结果表明: 杂种野猪肉的钙激活蛋白酶活性较高, 但表现酶活性的自溶率变化在早期较慢; 电泳图谱可看到, 杂种野猪蛋白降解较慢, 在宰后冷藏 40 h 的电泳图可看到小分子物质降解较少。

关键词: 杂种野猪; 钙激活蛋白酶系; 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2007)2-0239-05

马俐珍, 王永辉, 范三红. 猪宰后肌肉中钙激活蛋白酶活性变化的研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(2): 239-243.

Ma Lizhen, Wang Yonghui, Fan Sanhong. Changes of calpain activity in postmortem meat of pig[J]. Transactions of the CSAE, 2007, 23(2): 239-243. (in Chinese with English abstract)

0 引言

嫩度是决定肌肉食用品质的重要指标之一, 研究表明: 肌肉内结缔组织、肌间脂肪及保水性等和肌肉的嫩度均有一定的相关性, 但不是影响肌肉嫩度的主要因素, 而宰后肌肉在成熟过程中, 骨架蛋白的降解对嫩度的提高起主导作用。Taylor(1995)^[1]等发现, 内源性的钙激活蛋白酶系对肌肉骨架蛋白的降解有重要的作用。他们用钙激活蛋白酶的提取液处理分离的肌原纤维, 结果发现, 肌原纤维的 Z 线崩溃并逐渐消失, 很大程度上削弱了肌原纤维, 同时肉的嫩度也得以大大提高。目前, 大量的研究已证实: 钙激活蛋白酶系广泛存在于各组织中, 与活体时动物的生长速度和宰后肌肉的嫩化有着密切的关系。

杂种野猪是经过人工驯化和科学育种而获得的新品种。与普通家猪相比, 具有更好的食用品质, 其肉色泽鲜艳、风味独特、营养丰富、具有良好的加工性能和耐贮藏性, 是一种具有野味的高蛋白、低脂肪的肉食品, 能更好地满足现代人们消费需求^[2,3]。但是实验也表明, 杂种野猪肉的嫩度较差^[2]。肌肉食用品质的形成, 是宰后肌肉经过一系列生理学、组织学和生物化学变化作用的结果。近几年来国内外对杂种野猪的研究主要集中在育种、饲养、宰后胴体性状和肌肉的营养价值等方面的研

究^[3]。而对决定肌肉的复杂变化的蛋白酶研究很少, 为此山西农业大学动物科技学院牧站引进华北野公猪, 与本地普通白猪进行杂交, 产生 F1 代杂种野猪, 在相同条件下饲养 F1 代杂种野猪和本地白猪, 待 8 个月后同时屠宰。分析宰后肌肉中钙激活蛋白酶活性的变化, 同时, 在以往研究杂种野猪和本地白猪宰后的 pH 值变化和肌肉品质特性变化的基础上^[2,4], 结合宰后 40h 的全蛋白电泳, 对杂种野猪和本地白猪的品质特性进行分析研究, 从而对猪的育种、畜牧养殖和宰后肌肉成熟变化机理提供理论依据, 同时对杂种野猪肉的系列产品深度开发有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设备

试验猪: 山西农业大学动物科技学院牧站饲养的 F1 杂交野猪(野猪♂×本地白猪♀) 8 头和本地白猪 6 头, 体重达 90 kg 后各随机屠宰 1 头; 试验肉: 分别取屠宰后的野猪和本地白猪左半胴体第 1~2 腰椎处背最长肌为肌肉品质测定的材料。

Tris、β-巯基乙醇(mercaptoethanol, MCE)、甘氨酸、Ac(丙烯酰胺)、Bis(N', N'-甲叉双丙烯酰胺)、考马斯亮蓝、TEMED(N, N, N', N'-四甲基乙二胺)、SDS(十二烷基磺酸钠)、乙酸、NH₄SO₄、KCl、HCl、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、EDTA(乙二胺四乙酸)、CaCl₂、NaOH、三氯乙酸、甘油、溴酚蓝、甲醇、酪蛋白等, 均购于原平皓生物试剂有限公司, 均为 Sigma 分装试剂。

高速组织捣碎机(DS-1 型, 上海标本模型厂)、酸度计(pHS-3C 型, 上海雷磁仪器厂)、高速冷冻离心机(德

收稿日期: 2005-12-31 修订日期: 2006-11-06

基金项目: 山西农业大学博士后基金

作者简介: 马俐珍(1963-), 教授, 博士, 主要从事肉类科学研究。天津 天津市南开区红旗路保山道金典花园 8-2-202, 300190。

Email: malizhen-6329@163.com

国 eppendorf centrifuge 5417)、离心机(TGL. 16G 型, 北京医用离心机厂)、紫外可见分光光度计(752-型, 上海光谱仪器有限公司)、电泳仪、垂直电泳槽(DYY-III 型, 北京市六一仪器厂)、透析袋(截留分子量 10000~12000)、水浴锅(上海医疗器械五厂)。

1.2 试验设计

试验肉在 0℃ 冷藏条件下, 测定肌肉中钙激活蛋白酶系活性变化、肌肉 pH 值变化和肌肉全蛋白提取液电泳变化。

1.2.1 钙激活蛋白酶系酶活性测定

屠宰后, 立即取样(背最长肌), 将背最长肌表面的筋腱和脂肪去除后, 均匀分割成 2 cm³ 的小块, 分成 10 组, 每组 3 块, 保鲜膜包裹, 置 0℃ 下保存待测。0~ 72 h 内, 每隔 8 h 测定一组, 结果取 3 次平均值。

1.2.2 肌肉全蛋白提取液电泳试验

在 0 h 和 40 h, 分别提取杂种野猪肉和本地白猪肉的肌肉全蛋白 3 次。然后, 混合 3 次提取的溶液, 震荡 0.5 h, 作为电泳上样品。

电泳试验完毕后, 观察和分析两种肉分别在 0 h 和 40 h 时的电泳图的差异, 得出蛋白质的降解情况。

1.3 测定方法

1.3.1 钙激活蛋白酶系粗酶液的提取方法

主要分为以下四步^{5,6]}:

1) 匀浆

肉样去除脂肪、筋和腱后, 取 10 g。置于匀浆机中, 加入总量为 25 mL 0℃ 的提取液 A (内含 4 mmol/L EDTA 和 0.17 mol/L Tris-HCl, pH 7.9, 用 1 mol/L 乙酸调节) 进行匀浆。25 mL 的提取液 A 分 10 mL、10 mL 和 5 mL 3 次加入。每次加入后, 匀浆 30 s 停 1 min, 速度为 15000 r/min, 温度控制在 0℃ 左右。

2) pH 值控制和等电点沉淀

取匀浆液, 在 0℃、6000 r/min 下冷冻离心 40 min, 纱布滤除上清液上浮的脂肪, 1 mol/L 乙酸调节滤液的 pH 到 6.1~ 6.2, 置 0℃ 下 20 min, 再冷冻离心 30 min (0℃, 6000 r/min)。取上清液, 仍用 1 mol/L 乙酸调节上清液 pH 值到 4.9~ 5.0 (酶的等电点)。在 0℃ 下静置 20 min 后, 再在 0℃、6000 r/min 下冷冻离心 20 min, 取沉淀, 在低温条件下, 立即用 7 mL 提取液 A 将沉淀溶解, 并用蒸馏水将溶液稀释至 20 mL。

3) (NH₄)₂SO₄ 盐析纯化

在 0℃、14000 r/min 下, 冷冻离心稀释液 1 h, 取上清液。在低温条件下, 向上清液中加入 0~ 1.8 mol/L 的 (NH₄)₂SO₄ 溶液(边搅边加, 以防盐浓度局部过高而导致酶失活), 通过盐析原理, 使蛋白酶溶解度下降。然后, 在 0℃、14000 r/min 下, 冷冻离心溶液 20 min, 酶沉淀

下来。

4) 透析纯化

取酶沉淀, 用 10 mL 0.05 mol/L Tris-HCl 和 4 mmol/L EDTA (pH 7.0) 的缓冲溶液溶解沉淀, 待沉淀全部溶解后, 将溶液移入透析袋(截留分子量 10000~12000), 用 20 mmol/L Tris-base 溶液, (内含 5 mmol/L EDTA 和 10 mmol/L β-巯基乙醇, pH 7.5) 在 0~ 4℃ 的条件下透析 48 h (其间换透析液 5~ 6 次), 透析完成后, 透析袋中的溶液 0℃、14000 r/min 离心 1 h, 上清液即为钙激活蛋白酶的粗酶液。

1.3.2 钙激活蛋白酶系活性的测定方法

用碱变性的酪蛋白作为测定钙激活蛋白酶系活性的底物。

含 Ca²⁺ 反应液为 100 mmol/L tris-base, 10 mmol/L β-巯基乙醇, 0.5 mg/mL CaCl₂, pH 用 1 mol/L 乙酸调至 7.5。含 EDTA 空白反应液为 100 mmol/L tris-base, 10 mmol/L β-巯基乙醇, 10 mM EDTA, pH 值用 1 mol/L 乙酸调至 7.5。

0.5 mL 的钙激活蛋白酶系提取液加 1.5 mL 的含 Ca²⁺ 反应液(或 1.5 mL 含 EDTA 空白反应液)在 25℃ 反应 60 min, 加入 2 mL 的三氯乙酸终止反应, 5000 r/min 离心 20 min, 然后测定上清液在 278 nm 波长下的吸光值 A_{278nm}。

一个单位的钙激活蛋白酶系活性定义为 25℃ 反应 60 min, 在 278 nm 增加 1.0 吸光值单位催化反应所需酶的量。

钙激活蛋白酶系活性 = (含 Ca²⁺ 反应液的 A_{278nm}) - (含 EDTA 空白反应液 A_{278nm})

1.3.3 pH 值测定

取肉样切掉表层 0.2 cm 的薄片, 然后将脂肪、结缔组织除去, 并切碎, 取碎肉 10 g 放于烧杯中, 再加入预先冷却的蒸馏水 100 mL 蒸馏水, 在摇床中振摇 30 min 后过滤。用 pH 计测定滤液的 pH 值^{7]}。

1.3.4 全肌肉蛋白样品的制备

将 4 g 肉样绞碎, 加入 10 mL 提取液 [2% SDS (W/v), 10 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.0], 匀浆 30 s, 1500 r/min 下离心 15 min, 除去不溶成分后的溶液即为全肌肉蛋白的溶液。

用全肌肉蛋白提取液将全肌肉蛋白浓度稀释至 1.5 mg/mL, 备用。以上操作均在 25℃ 进行^{18]}。

1.3.5 全肌肉蛋白溶液的 SDS-PAGE 电泳

根据样品主要蛋白分子量大小确定: 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%。

将全肌肉蛋白与 5 倍样品缓冲液 (60 mmol/L Tris-HCl, 25% 甘油, 2% SDS, 14.4 mmol/L 2-巯基乙

醇, 0.1% 溴酚蓝, pH 6.8) 以 4:1 混匀。在沸水浴中煮 3~5 min, 离心 2~3 min, 上样 30 μg 。标准蛋白中, 鸡蛋清溶菌酶分子量 14400, 胰蛋白酶抑制剂 20100, 牛碳酸酐酶 31000, 兔肌动蛋白 43000, 牛血清白蛋白 66200, 兔磷酸化酶 97400。

80 V 恒压电泳, 待蛋白进入分离胶后调至 120 V, 恒压电泳 4 h。

考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。用牛血清白蛋白作标样制作蛋白浓度标准曲线。

2 结果与分析

2.1 钙激活蛋白酶系活性分析

通过对杂种野猪和本地白猪宰后冷藏条件下钙激活蛋白酶活性的测定, 结果见图 1 所示。从图 1 可知, 刚宰后, 杂种野猪肌体内含有的钙激活蛋白酶系活性较高, A_{278} 为 0.78, 本地白猪为 0.56。在冷藏过程中, 肌肉内钙激活蛋白酶系酶的活性急剧下降, 从下降速率上看, 在 0~40 h 内, 杂种野猪肉内的钙激活蛋白酶系酶的活性对应于本地白猪下降较慢, A_{278} 从 0.78 下降为 0.50, 下降了 0.28, 而本地白猪的 A_{278} 从 0.56 下降为 0.21, 下降了 0.35。在随后的 40~72 h 内, 杂种野猪肉内钙激活蛋白酶系酶的下降低率超过了本地白猪肉, A_{278} 从 0.5 下降为 0.36, 下降了 0.14, 而本地白猪的 A_{278} 从 0.21 下降为 0.11, 下降了 0.10。但到 72 h 后, 杂种野猪肉的钙激活蛋白酶系酶的活性仍高于本地白猪。

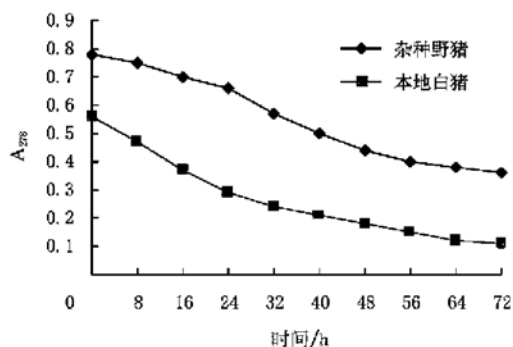


图 1 在冷藏中钙激活蛋白酶的活性变化

Fig. 1 Changes of calpain activity during cooling store

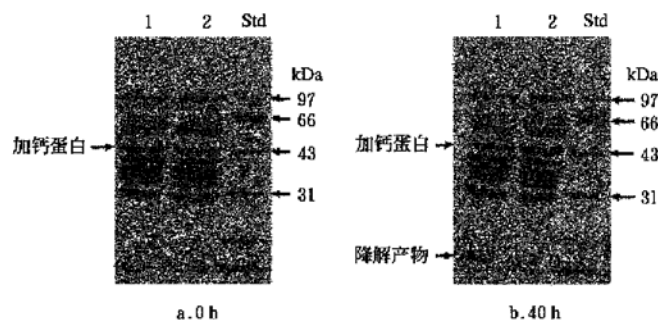
由于品种的差异, 屠宰后, 机体正常机能遭到破坏, 温度和 pH 值的下降将会造成钙激活蛋白酶系酶活性的下降; 但是, 肌肉内 ATP 的逐渐消失和 pH 值的下降又会升高肌肉内 Ca^{2+} 浓度, 这又会大大激活钙激活蛋白酶系的活性。从酶活性的作用机理上可知, 钙激活蛋白酶系是通过 Ca^{2+} 激活和自溶来表现活力的^[9]。因此, 图 1 中两种肉的酶活性的下降速率才是代表各自酶的活力。在 0~40 h 内, 由于杂种野猪肉 pH 值下降缓慢

和组织特性较硬的特性, 肌体内 Ca^{2+} 浓度上升较慢, 直接影响了钙激活蛋白酶系降解蛋白的能力, 导致了肌肉成熟嫩化缓慢, 因此, 本地白猪较快地完成了成熟, 而杂种野猪肉的成熟进行的较为缓慢。

2.2 全蛋白电泳图谱分析

图 2a 可看到在 0 h 时, 两种肉的电泳图区别不大, 小分子蛋白质较少。当冷藏到 40 h 后, 从图 2b 的电泳图谱可知, 两种猪的肌钙蛋白 (43 KDa) 都有不同程度的降解, 同时, 产生了分子量小于 30 KDa 的小片段蛋白, 但是, 从降解的数量上看, 杂种野猪肉的小片段蛋白明显较本地白猪的少。

Taylor 等^[1]研究表明, 钙激活酶系对离体后的肌间线蛋白和肌钙蛋白 T 有明显的降解作用, 且降解的产物和宰后肌肉自然成熟条件下降解的产物类似, 而溶酶体组织蛋白酶在肌肉成熟的早期对嫩度的提高贡献不大, 故可推断小分子蛋白的产生就是钙激活酶系降解肌肉内某骨架蛋白的结果。但在杂种野猪肉中, 由于钙激活酶系在宰后的 40 h 内变化速率较小, 表现的降解作用也小, 导致小分子蛋白的蓄积也少, 故在图 2b 的电泳图上, 可看到降解产物本地白猪的小分子蛋白较多, 而杂种野猪的小分子蛋白较少, 这也可充分验证了在宰后肌肉中钙激活蛋白酶系在杂种野猪肉中活性较小。



注: 1—本地白猪; 2—杂种野猪; Std—标准蛋白

图 2 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 Map of SDS-PAGE

研究表明^[10], 钙激活蛋白酶系存在于肌肉细胞内部, 在 Z 线中浓度最高。在降解肌肉蛋白过程中, 受 Ca^{2+} 和钙激活蛋白酶抑制蛋白的调节。 Ca^{2+} 可使酶构象发生变化, 自溶后表现蛋白水解的活性; 而钙激活蛋白酶抑制蛋白是专一性抑制钙激活蛋白酶活性的内源蛋白, 它可以识别钙蛋白酶与钙结合后引起的构象变化并与其特异结合, 起到抑制钙激活蛋白酶系活性的作用, 这可能起到防止钙蛋白酶被随机激活的作用, 从而保证钙蛋白酶对底物只进行局部特定位点水解。钙激活蛋白酶系主要作用对象是肌原纤维中的某些骨架蛋白^[11], 可使肌原纤维释放出肌丝, 释放的肌丝可与母体

或其它肌原纤维重新装配,也可被组织蛋白酶进一步降解,故钙激活蛋白酶系还是肌肉蛋白质降解的重要限速步骤,对宰后肌肉的成熟嫩化起着重要的作用。

根据表现最高活性激活所需 Ca^{2+} 浓度不同,钙激活蛋白酶系可分为 μ -钙蛋白酶和 m -钙蛋白酶两种主要的同源型钙激活蛋白酶。另外,钙蛋白酶抑制蛋白也是钙激活蛋白酶系的重要组成部分。钙激活蛋白酶系被 Ca^{2+} 激活的机理已很清楚^[12], μ -钙蛋白酶和 m -钙蛋白酶都是由大小两个亚基组成,当大小亚基结合时,钙激活蛋白酶系不具有活性,经 Ca^{2+} 激活后,其大小亚基分离,分离后的大小亚基迅速降解自溶,自溶后马上被周围的钙激活蛋白酶抑制蛋白结合,活性受到抑制,当 Ca^{2+} 浓度进一步提高,钙激活酶表现出了降解蛋白的活性,同时,降解底物蛋白后,活性也随之丧失。从激活机理中可发现,钙激活蛋白酶的自溶是其发挥降解特性的前提^[13],因此,将钙激活蛋白酶系看成一个酶原,而钙激活蛋白酶系活性下降则是其发挥降解作用的标志。

在一些研究中,测定钙激活酶活性时,都是将 μ -钙蛋白酶、 m -钙蛋白酶和钙蛋白酶抑制蛋白经过非常繁琐复杂的多步手段从肌肉蛋白中分离纯化,采用对应的底物来测定酶的活性,其结果则作为酶活性的值。笔者认为,此方法测定钙激活蛋白酶的活性并不准确。首先,在分离纯化过程中,由于步骤较多,酶的数量很难避免丢失,再有,测定的结果,是在最适条件(pH 7.5、温度 25°C 下反应 60 min)和钙离子浓度充足(在测定时,底物中一般都添加 CaCl_2 ,足可激活 μ -钙蛋白酶和 m -钙蛋白酶)的情况下,测定出来的值,而且此值代表的仅仅是肌肉中未被肌肉内源性的钙离子激活的、还未表现降解活性的、剩余钙激活蛋白酶系,因此,此测定结果并不能代表对应时间的酶活性。在本试验中,将钙激活蛋白酶系看作一个整体(包括钙蛋白酶抑制蛋白),钙激活蛋白酶的活性是所对应时间内的变化率,即在冷藏条件下和一定的时间内,被内源性钙离子激活后表现了降解活性的自溶掉的那部分。

温度和 pH 值对钙激活蛋白酶系统的活性也有一定的影响,有研究表明^[14],温度在 $25^\circ\text{C}\sim 40^\circ\text{C}$, 都有较高的活性,达到 45°C 以后活性会很快降低; pH 值越接近中性,钙激活蛋白酶系酶的活性就越高,当达到 7.5 时,酶的活性最大。因为宰后肌肉的 pH 值会逐渐下降,这可降低钙激活蛋白酶系的活性,但 pH 值的下降,有助于肌质网膜和线粒体膜破裂,促使肌浆内的 Ca^{2+} 浓度升高,这又会激活钙激活蛋白酶系的活性,因此,提取纯化的钙激活蛋白酶系随 pH 值的下降而下降,但在复杂的宰后的肌肉体系中, pH 值的下降未必会使钙激活蛋白酶系活性下降。

在肌肉组织中,钙激活蛋白酶系控制着肌原纤维的降解,是肌肉蛋白降解的限速酶,因此,与宰后肌肉的成熟嫩化有着直接的关系,从图 2 可看到,两种肉在冷藏中,肌钙蛋白发生了明显的降解,产生了小于 30 KDa 的小片断蛋白,而大量的实验表明这种降解产物和肌肉的嫩度高度相关^[15]。由于杂种野猪肉中钙激活蛋白酶系的活性下降速率较慢,导致了肉质嫩化成熟缓慢,而本地白猪肉的酶活性表现较大,这样,有利于缩短本地白猪肉的成熟时间。

3 结 论

杂种野猪肉的钙激活蛋白酶活性较高,但表现酶活性的自溶率变化在早期较慢;初始 pH 值较高,但在下降中变化速率较低;电泳图谱可看到,杂种野猪蛋白降解较慢,在 40 h 的电泳图可看到小分子物质降解较少。

[参 考 文 献]

- [1] Taylor R G, Geensink G H, Thompson V F, et al. Is Z-disk Degradation responsible for postmortem tenderization[J]. *J Anim Sci*, 1995, 73: 1351- 1367.
- [2] 王永辉,马丽珍,张亚杰,等. 杂种野猪宰后肌肉品质特性的研究[J]. *农产品加工学*, 2005, 50(12): 15- 19.
- [3] 陈国顺,孟州. 杂种野猪 F1×Y 杂交后代肉质特性的研究报告[J]. *广西畜牧兽医*, 2004, 20(4): 150- 153.
- [4] 王永辉,马丽珍,张建荣,等. 特种野猪和普通家猪屠宰后的 pH 值变化分析[J]. *肉类研究*, 2006, 4: 40- 43.
- [5] 韦薇. 钙激活酶-钙激活酶抑制蛋白系统对成肌细胞融合的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2000.
- [6] Koochmarai M. Role of neutral proteinases in postmortem muscle degradation and meat tenderness[J]. *Proc Recip Meat Conf*, 1992, 45: 63- 74.
- [7] 许益民译. 肉和肉制品 pH 值的国际测定标准方法[J]. *中国动物保健*, 2000, 5(15): 27.
- [8] 黄明. 牛肉成熟机理及食用品质研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [9] Tucker G A, Woods L F J. 酶在食品加工中的应用[J]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [10] Cong J, Goll D E, Peterson A M, et al. The role of autolysis in activity of the Ca^{2+} -dependent proteinases (u -calpain and m -calpain) [J]. *Biol Chem*, 1989, 264, 10096- 10103.
- [11] Croll D E, Demartino G N. Calcium-activated neutral protease(calpain) system: Structure, function, and Regulation[J]. *Physiological Reviews*, 71(3): 813- 847.
- [12] Goll D E, Thompson V F, Taylor T, et al. Roles of calpain system in muscle growth[J]. *Biochem J*, 1992, 74: 225- 237.
- [13] Johnson M H. Differences in cathepsin B+ L and calcium-dependent protease activities among bread type and their

- relationship to beef tenderness. [J]. Anim Sci, 1990, 68: 2371- 2379.
- [14] 孔保华. 肌肉蛋白酶和肉的成熟嫩化[J]. 肉类研究, 1994, (4): 15- 17.
- [15] Busch W A. A Ca^{2+} -specific removal of Z-lines from rabbit skeletal muscle[J]. J Cell Biol, 1972, 52: 376.

Changes of calpain activity in postmortem meat of pig

Ma Lizhen¹, Wang Yonghui², Fan Sanhong³

(1. Food Science Department, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China;

2. Arid farming reseach center, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;

3. School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Calpain activity changes of wild hybrid pig and home white pig were investigated, and SDS-PAGE analyzsis on extracting solutions of whole protein in the meat was done. Results indicate that the crossbred wild pigs' activities of calpains is more higher, however, the rate of autolysis expressing the activity of calpains at the early stage is very slower; The map of SDS-PAGE photographs show that proteolysis of crossbred wild pig is slower than that of home white pig. Also its small molecular material degraded comparatively slower from SDS-PAGE map after 40-hour cold storage.

Key words: wild hybrid pig; calpains; SDS-PAGE