

不同嫩度羊肉肌浆蛋白质磷酸化水平随宰后成熟时间变化的研究

陈立娟¹, 李欣¹, 杨扬¹, 陈丽¹, 倪娜¹, 张德权^{1,2}

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工综合性重点实验室, 北京 100193)

(2. 食品安全与营养协同创新中心, 北京 100193)

摘要: 本文研究了不同嫩度羊肉肌浆蛋白磷酸化水平随宰后成熟时间的变化。取40只羊宰后0.5 h、1 h、4 h、12 h、24 h背最长肌样品, 根据24 h剪切力和肌原纤维小片化指数分为高嫩度组和低嫩度组。采用SDS-PAGE电泳、荧光染色等方法, 分析肌浆蛋白的磷酸化水平。研究结果表明在宰后24 h内肌浆蛋白磷酸化水平在不同嫩度和宰后成熟时间处理组之间差异显著($P < 0.05$), 低嫩度组的整体蛋白质磷酸化水平在宰后4 h达到最大, 高嫩度组的整体蛋白质磷酸化水平在宰后12 h达到最大。宰后0.5 h、1 h、4 h低嫩度组的肌浆蛋白整体磷酸化水平显著高于高嫩度组($P < 0.05$)。因此, 肌浆蛋白磷酸化水平受不同嫩度和宰后成熟时间处理影响显著($P < 0.05$), 磷酸化可能通过对宰后肌肉糖酵解的作用影响宰后肌肉僵直进程, 进而影响肌肉嫩度。

关键词: 羊肉; 嫩度; 宰后成熟时间; 肌浆蛋白; 蛋白质磷酸化

文章编号: 1673-9078(2015)4-95-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.016

Analyzing the Changes in Sarcoplasmic Protein Phosphorylation with Respect to Postmortem Ageing Times in Mutton with Different Levels of Tenderness

CHEN Li-juan¹, LI Xin¹, YANG Yang¹, CHEN Li¹, NI Na¹, ZHANG De-quan^{1,2}

(1. Institute of Agro-Products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China) (2. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Beijing 100193, China)

Abstract: The major aim of this study was to investigate the changes in the levels of phosphorylation of sarcoplasmic proteins with respect to the postmortem ageing time in mutton with different levels of tenderness. Longissimus muscle samples of 40 sheep were collected at 0.5, 1, 4, 12, and 24 h postmortem, and were divided into two groups (high-level-of-tenderness and low-level-of-tenderness) based on the shear force and myofibrillar fragmentation index (MFI) at 24 h postmortem. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was combined with fluorescence staining in order to analyze the level of phosphorylation of sarcoplasmic proteins. The results of these analyses indicated that groups with different degrees of tenderness and postmortem times showed significantly different levels of sarcoplasmic protein phosphorylation within 24 h (postmortem). The highest levels of protein phosphorylation in the low-level-of-tenderness and high-level-of-tenderness groups were observed at 4 and 12 h postmortem, respectively. In addition, the global levels of sarcoplasmic protein phosphorylation observed in the low-level-of-tenderness group at 0.5, 1, and 4 h postmortem were significantly higher than those observed in the high-level-of-tenderness group. Therefore, the level of sarcoplasmic protein phosphorylation was significantly affected by the varying degrees of tenderness and the different postmortem times ($P < 0.05$); moreover, it was theorized that protein phosphorylation influences *rigor mortis* in postmortem muscles through glycolysis, thereby affecting muscle tenderness.

Key words: mutton; tenderness; ageing time; sarcoplasmic proteins; protein phosphorylation

收稿日期: 2014-07-28

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303083); 国家农业科技创新工程

作者简介: 陈立娟(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肉品科学与技术

通讯作者: 张德权(1972-), 男, 博士生导师, 研究方向: 肉品科学与技术

蛋白质是生物体细胞中主要的功能行使者,生命活动与蛋白质的动态变化密切相关。大多数情况下蛋白质的绝对量并不会发生显著变化,而是通过各种翻译后修饰来完成或改变其功能。常见的修饰方式有磷酸化、乙酰化、泛素化、甲基化等,在数量众多的蛋白质翻译后修饰中,磷酸化修饰是最常见、最重要的一种,细胞发育、增殖、信号转导、凋亡、肌肉收缩等生命活动都受蛋白质磷酸化和去磷酸化这一可逆过程调节^[1]。随着磷酸化蛋白质组学技术的发展,国内外已开展关于小鼠、牛、兔等动物肌肉组织蛋白质磷酸化的研究。

糖酵解作为宰后肌肉的主要能量代谢方式,是影响宰后 pH 下降速率的主要因素,对于宰后肌肉成熟过程具有重要意义。许多糖代谢酶如糖原磷酸化酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶等都是磷酸化蛋白质,因此蛋白质磷酸化在宰后肌肉糖酵解中起着关键作用。例如, D'Alessandro (2013)^[2]、Li(2012)^[3]等人提出了“磷酸化诱导酶活降低”学说,认为磷酸化水平越高糖酵解酶活性越低,不利于宰后肌肉中糖酵解反应的进行。

pH、肌肉收缩和蛋白降解是影响宰后肌肉品质变化的重要因素,对肌肉的僵直进程和嫩化过程有重要影响。蛋白质磷酸化可以通过影响肌球蛋白轻链结构促进肌肉收缩^[4],通过影响钙蛋白酶抑制蛋白活性等降低蛋白降解^[5]。但是目前国内关于宰后肌肉蛋白质磷酸化水平的研究较少。

鉴于蛋白质磷酸化反应对影响肉嫩化的 pH、肌肉收缩和蛋白降解等因素有重要影响,本实验利用 SDS-PAGE 电泳和特异性荧光染色(Pro-Q Diamond),研究不同嫩度羊肉中肌浆蛋白磷酸化水平随宰后成熟时间的变化,旨在为肉品嫩度的预测和改善提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本实验所用材料为 40 只 6 月龄大尾寒羊×小尾寒羊的杂交公羊,未去势,胴体重 20.08±1.71 kg。实验羊集中规模饲养,统一管理,同群且补饲条件相同。由山西朔州金龙养殖园区提供。

主要试剂:蛋白酶抑制剂(Roche Complete)和磷酸酶抑制剂(Roche PhosStop)购自瑞士 Roche 公司;蛋白浓度测定试剂盒(BCA protein assay kit)购自美国 Pierce 公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris Base)、十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺(Acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺(methylene diacrylamide)、过硫酸铵

(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)购自美国 Sigma 公司;Pro-Q Diamond、SYPRO Ruby 染色液购自美国 Invitrogen 公司;乙醇、乙酸、乙腈等为国产分析纯试剂,购自北京化学试剂公司。

1.2 实验仪器

Testo 205 便携式 pH 计,德国德图公司;TA-XT2i 质构仪,英国 Stable Micro System 公司;Ultra Turrax Disperser S25 分散器,德国 IKA 公司;Neofuge 高效冷冻离心机,上海力申科学仪器有限公司;T6 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;ML204/02 电子天平,上海梅特勒-托利多有限公司;Chameleon V 多功能酶标仪,芬兰 Hidex 公司;电泳设备(Mini-PROTEAN Tetra System),美国 Bio-Rad 公司;Typhoon Trio 多功能激光成像系统,美国 GE 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 取样

采用清真屠宰法屠宰羊只,宰后立即剥皮取出背最长肌,在 0℃下存放。从断喉时开始计时,分别取宰后 0.5 h、1 h、4 h、12 h 和 24 h 背最长肌样品,液氮速冻带回实验室,于-80℃冰箱中保存用于蛋白质磷酸化水平的测定。另取宰后 24 h 背最长肌样品用于剪切力的测定,保存于-20℃冰箱中。

剪切力的测定:参考农业行业标准^[6],取背最长肌在 4℃条件下冷藏解冻 12 h,剔除筋膜,将其修整为(6×6×3)cm 的肉块,放入恒温水浴锅中 80℃加热,待肉样中心温度达到 70℃时,将肉样取出冷却至中心温度为(0~4)℃,切成(1×1×3)cm 的小块,用质构仪测定其剪切力。

肌原纤维小片化指数(MFI)的测定:参考 Culler(1978)等^[7]的方法并稍作调整。剪取 2 g 经修整后的肉样品,放入匀浆器中,加 20 mL 预冷(2℃)的 MFI 缓冲液(100 mmol/L KCl, 11.2 mmol/L K₂HPO₄, 8.8 mmol/L KH₂PO₄, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L NaN₃),高速匀浆 3 次,每次 20 s,匀浆后用 50 mL 离心管冷冻离心(1000 r/min、15 min、2℃),弃去上清,将沉淀用 20 mL 预冷后的 MFI 缓冲液悬浮,再离心(1000 r/min、15 min、2℃),弃去上清,用 5 mL 预冷后的 MFI 缓冲液将沉淀充分悬浮,将悬浮液用 150 目滤布过滤除去结缔组织,再用 5 mL MFI 缓冲液洗离心管,并进行过滤,将过滤后的悬浮液用双缩脲法测蛋白浓度,然后用 MFI 缓冲液调整悬浮液蛋白浓度为 0.5 mg/mL,在 540 nm 测吸光度,

将所得结果乘 200 后便得到 MFI 值。

pH 值的测定: 用便携式 pH 计在胴体左侧背最长肌第 12~13 肋处测定 pH, 探头插入深度为 2 cm, 连续测定 3 次, 结果取平均值。

1.3.2 样品制备

参照 Lametsch 等^[8]的方法并稍作修改。将 1 g 肌肉组织加入 6 mL 预冷的缓冲剂(100 mM Tris, 10 mM DTT, pH8.3, 蛋白酶抑制剂, 磷酸酶抑制剂)中, 用 Ultra Turrax S25 匀浆机进行匀浆, 然后在 10000 r/min (4 °C)下离心 30 min 得到的上清液即为肌浆蛋白, 肌浆蛋白的浓度用 BCA 试剂盒测定。

1.3.3 SDS-PAGE 电泳

将样品与上样缓冲液等体积混合后在沸水浴中加热 3 min, 冷却后 12000 r/min 离心 2 min, 取上清液上样, 肌浆蛋白的上样量为 5 μg。将电泳缓冲液加入电泳槽中进行电泳。设置初始电压为 70 V, 当染料进入分离胶后, 将电压恒定在 120 V, 继续电泳直至染料到达离凝胶底部 0.5 cm 处。

1.3.4 荧光染色和图像扫描

Pro-Q Diamond 染色:

固定: 固定液: 50% 甲醇、10% 乙酸; 每次约 100 mL, 每次 30 min, 固定 2 次以确保胶上 SDS 被洗净。

水洗: 以双蒸水洗胶三次, 每次约 100 mL, 每次 10 min。

染色: 倒入荧光染料 Pro-Q Diamond, 避光孵育染色 60 min。

脱色: 脱色液: 20% 乙醇、50 mM 乙酸钠 pH4; 脱色三次, 每次约 100 mL, 每次 30 min。

水洗: 以双蒸水洗胶三次, 每次约 100 mL, 每次 5 min, 避光操作。

SYPRO Ruby 染色:

染色: 50 mL SYPRO Ruby 染色液, 避光孵育 12 h。

脱色: 脱色液: 10% 乙醇, 7% 乙酸; 脱色两次, 每次约 100 mL, 每次 30 min。

水洗: 以双蒸水洗胶三次, 每次约 100 mL, 每次 5 min, 避光操作。

使用 Typhoon Trio 多功能激光成像系统对染色后的凝胶进行扫描。Pro-Q Diamond 染色后的凝胶在激发波长为 532 nm、发射波长为 580 nm、分辨率为 200 mm 的条件下扫描。SYPRO Ruby 染色后的凝胶在激发波长为 532 nm、发射波长为 610 nm、分辨率为 200 mm 的条件下扫描。

1.3.5 图像分析

利用 Quantity One 4.6.2 软件 (Bio-Rad, 美国) 对条带光密度值进行定量, 得到每个条带的 Pro-Q Diamond 染色光密度值(P)和SYPRO Ruby 染色光密度值(T), 同一条带的光密度值之比 P/T 即为该条带蛋白的蛋白质磷酸化水平, 样品的整体蛋白质磷酸化水平为包括所有蛋白条带的整个泳道的 P/T 值^[9]。

1.4 统计分析

采用 SAS V8.0 软件对数据进行统计分析, 以嫩度、宰后成熟时间、嫩度与宰后成熟时间的交互作用三个因素作为变量, 平行样品作为随机因素进行分析。多重比较方法采用 Duncan 法, $P < 0.05$ 。结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与讨论

2.1 嫩度指标测定结果及分析

根据 40 个样品的剪切力和 MFI, 选取剪切力较大(130.64±24.25 N)、MFI 较小(73.40±6.20)的 4 个样品作为低嫩度组, 剪切力较小(75.75±7.39 N)、MFI 较大(99.55±4.31)的 4 个样品作为高嫩度组。经分析, 高、低嫩度组剪切力及 MFI 存在极显著性差异($P < 0.01$)。

表 1 剪切力、MFI、pH 值测定结果

Table 1 Results of the analysis of shear force, MFI, and pH

组别	剪切力/N	MFI (24 h)	pH (4 h)	pH (12 h)	pH (24 h)
高嫩度组(平均值±标准差)	75.75±7.39	99.55±4.31	6.49±0.18	5.91±0.09	5.67±0.06
低嫩度组(平均值±标准差)	130.64±24.25	73.40±3.20	6.69±0.22	6.03±0.14	5.71±0.05

剪切力为反应肉嫩度的最常用指标。肌原纤维的小片化释放僵直时肌肉收缩所形成的张力, 是肉嫩度增加的原因, 二者具有高度相关性, MFI 也常被用作肉嫩度指标。因此, 我们根据剪切力和 MFI 将采集到的羊肉分为高嫩度组和低嫩度组。

2.2 肌浆蛋白 SDS-PAGE 电泳图分析

低嫩度组与高嫩度组肌浆蛋白在宰后 0.5 h、1 h、4 h、12 h 和 24 h 的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 1、图 2 所示。其中图 1 是 Pro-Q Diamond 染色的磷酸化蛋白质, 图 2 是 SYPRO Ruby 染色的肌浆全蛋白。由图可见, 条带平直清晰, 分离效果较好。从图中选取 18 个较清晰条带, 对其相对光密度进行分析。

实验分别用 Pro-Q Diamond 染料和 SYPRO Ruby

染料来识别磷酸化蛋白质和全蛋白质，采用半定量方法，以 Pro-Q Diamond 染色荧光强度与 SYPRO Ruby 染色荧光强度之比作为每个条带的蛋白质磷酸化水平。条带 1、4、6、7、8、10、15、16 的 P/T 值大于 0.5，表明这些条带磷酸化程度较高。在 Pro-Q Diamond 染色时颜色较深的条带 4、6、10 在 SYPRO Ruby 染色时颜色较浅，而在 SYPRO Ruby 染色时颜色较深的条带 3、7、9 在 Pro-Q Diamond 染色时颜色却较浅，这种差别说明 Pro-Q Diamond 染料对磷酸化蛋白的特异性识别。

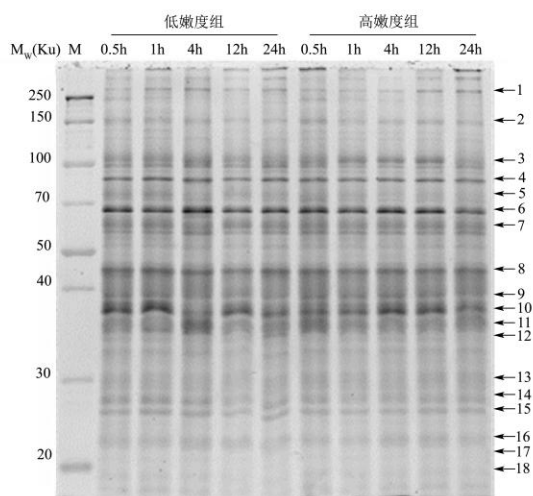


图 1 羊肉磷酸化肌浆蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE image displaying the phosphorylated sarcoplasmic proteins present in mutton

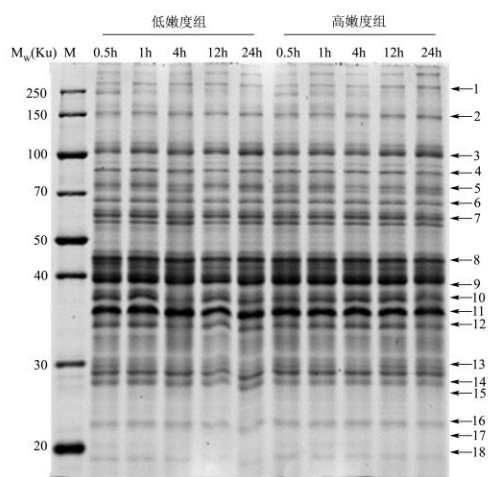


图 2 羊肉肌浆全蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE image displaying the total sarcoplasmic protein content present in mutton

2.3 不同嫩度羊肉中肌浆蛋白磷酸化水平随宰后成熟时间的变化

对电泳图中的 18 个条带进行分析，结果如表 2 所示，结果表明：条带 3、6、18 的磷酸化水平在不同嫩度和宰后成熟时间组之间差异显著 ($P < 0.05$)，条带 1、2、5、9、14、15 的磷酸化水平在嫩度和宰后成熟时间的交互作用下差异显著 ($P < 0.05$)，条带 8、10、16 的磷酸化水平仅在不同宰后成熟时间组之间差异显著 ($P < 0.05$)，条带 7 的磷酸化水平仅在不同嫩度组之间差异显著 ($P < 0.05$)。不同蛋白质条带出现最高磷酸化水平的的时间不同，条带 6、14 在宰后 4 h 蛋白质磷酸化水平最高，条带 8、10、17 在宰后 12 h 蛋白质磷酸化水平最高。另外，高嫩度组条带 16、18 的蛋白质磷酸化水平高于低嫩度组，低嫩度组的条带 4、6、7、12、14、15、17 的蛋白质磷酸化水平高于高嫩度组，说明低嫩度组的整体蛋白质磷酸化水平虽然较高，但并不是所有蛋白质的磷酸化水平都比高嫩度组高。

已有研究显示^[10-11]，条带 3 (102 ku) 可能为糖原磷酸化酶，糖原磷酸化酶的分子量约为 97.4 ku，本实验中分子量较大，推测原因可能是羊肉中糖原磷酸化酶被高度磷酸化，从而引起了分子量的变化，Huang (2012) 等人的研究中也出现了同样的现象^[9]。糖原降解是通过磷酸化和去磷酸化动力学过程进行的，糖原磷酸化酶通常以无活性的去磷酸化状态 b 存在，在磷酸化酶激酶和 Ca^{2+} 作用下糖原磷酸化酶丝氨酸-14 位点被磷酸化，由无活性的 b 转化为有活性的 a，并催化糖原降解为 1-磷酸葡萄糖，然后转化为 6-磷酸葡萄糖。条带 4 (83 ku) 可能为磷酸果糖激酶，磷酸果糖激酶可作用于果糖-6-磷酸，是糖酵解作用的限速酶之一，因此对该酶的调节是影响糖酵解作用的关键步骤。一方面，AMPK (即 AMP 依赖的蛋白激酶) 的激活会引起磷酸果糖激酶 2 磷酸化，磷酸化后磷酸果糖激酶 2 活性下降，减少 2, 6-二磷酸果糖产生，从而抑制糖酵解，减缓肌肉 pH 值下降；另一方面，磷酸化的磷酸果糖激酶会改变与 F-肌动蛋白的亲合力，而肌肉收缩会增加磷酸果糖激酶的磷酸化水平以及与 F-肌动蛋白的结合^[12]。条带 7 (58 ku) 可能为丙酮酸激酶，它也是糖酵解途径的限速酶之一。丙酮酸激酶催化磷酸烯醇丙酮酸(PEP)转化为丙酮酸，生成的丙酮酸在乳酸脱氢酶的催化下可变为乳酸，同时 NADH 被氧化为 NAD^+ 。但是有研究表明 AMPK 会抑制 L 型丙酮酸激酶的活性，进而抑制糖酵解。条带 8 (48 ku) 可能为 β -烯醇酶，它是糖酵解过程的限速酶，既可催化糖酵解过程中 2-磷酸甘油酸向磷酸-烯醇式丙酮酸的转化，又可在糖原合成过程中催化逆向反应，即作为磷酸丙酮酸水合酶，使磷酸-烯醇式丙酮酸向 2-磷酸甘油酸转化^[13]。条带 14 (27 ku) 可能为热休克蛋白

27, 热休克蛋白 27 是一个涉及到细胞生长、细胞凋亡、肿瘤的发生和转移等功能的重要蛋白, 当细胞在受到胁迫时, 热休克蛋白 27 表达量增加而且被磷酸化, 使

热休克蛋白 27 具有活性, 执行保护肌动蛋白等的功能。

表 2 不同嫩度羊肉中肌浆蛋白磷酸化水平分析

Table 2 Comparison of the sarcoplasmic protein phosphorylation between two mutton groups with different degrees of tenderness

条带	低嫩度组					高嫩度组	
	0.5 h	1 h	4 h	12 h	24 h	0.5 h	1 h
1	0.86±0.05	0.86±0.12	1.00±0.07	1.29±0.15	1.02±0.11	0.60±0.06	1.22±0.09
2	0.37±0.02	0.42±0.03	0.39±0.05	0.36±0.04	0.32±0.02	0.54±0.04	1.10±0.07
3	0.40±0.03	0.70±0.08	0.51±0.05	0.38±0.03	0.36±0.04	0.46±0.02	0.60±0.05
4	0.92±0.08	1.39±0.14	1.45±0.21	1.18±0.04	1.09±0.09	0.74±0.09	0.77±0.12
5	0.40±0.05	0.37±0.02	0.27±0.03	0.19±0.02	0.21±0.03	0.39±0.02	0.35±0.04
6	2.09±0.17	2.40±0.07	3.08±0.24	3.08±0.22	2.19±0.19	1.65±0.08	2.46±0.20
7	0.53±0.06	0.55±0.03	0.58±0.06	0.58±0.05	0.52±0.04	0.36±0.04	0.39±0.02
8	0.56±0.04	0.57±0.06	0.60±0.11	0.77±0.05	0.63±0.02	0.51±0.07	0.66±0.13
9	0.26±0.01	0.36±0.02	0.52±0.06	0.38±0.06	0.27±0.01	0.40±0.05	0.32±0.04
10	0.94±0.07	1.04±0.09	1.06±0.05	1.19±0.15	1.13±0.05	0.91±0.05	1.02±0.05
11	0.38±0.01	0.41±0.03	0.42±0.06	0.42±0.05	0.34±0.01	0.36±0.02	0.40±0.06
12	0.25±0.03	0.26±0.02	0.25±0.04	0.21±0.03	0.12±0.01	0.11±0.02	0.10±0.01
13	0.24±0.02	0.42±0.04	0.50±0.06	0.36±0.03	0.20±0.04	0.16±0.01	0.59±0.07
14	0.43±0.03	0.49±0.05	0.70±0.07	0.58±0.03	0.44±0.06	0.20±0.02	0.29±0.01
15	3.65±0.24	3.39±0.31	3.30±0.05	3.76±0.07	5.33±0.13	2.12±0.11	1.95±0.06
16	0.59±0.07	0.57±0.05	0.57±0.04	0.67±0.03	0.77±0.09	0.74±0.04	0.70±0.08
17	0.50±0.06	0.51±0.07	0.76±0.05	0.80±0.09	0.66±0.08	0.17±0.01	0.29±0.04
18	0.24±0.03	0.12±0.01	0.19±0.02	0.20±0.03	0.14±0.02	0.28±0.03	0.21±0.01

条带	高嫩度组			显著性分析 (P 值)		
	4 h	12 h	24 h	嫩度	时间	嫩度*时间
1	1.38±0.02	0.97±0.04	0.89±0.05	0.951	0.008	0.014
2	0.60±0.06	0.28±0.03	0.20±0.01	0.720	<0.0001	0.001
3	0.70±0.05	0.39±0.02	0.55±0.03	0.001	<0.0001	0.003
4	0.87±0.07	0.84±0.05	0.87±0.04	0.069	0.109	0.234
5	0.43±0.03	0.32±0.01	0.26±0.01	0.630	0.001	0.002
6	2.46±0.18	2.14±0.13	2.14±0.05	0.011	0.017	0.020
7	0.42±0.03	0.39±0.04	0.41±0.03	0.001	0.291	0.235
8	0.59±0.04	0.76±0.03	0.62±0.07	0.891	0.010	0.775
9	0.29±0.02	0.35±0.04	0.33±0.01	0.562	0.349	0.020
10	0.98±0.06	1.16±0.09	1.07±0.07	0.152	0.002	0.687
11	0.41±0.05	0.38±0.02	0.38±0.04	0.643	0.096	0.531
12	0.13±0.02	0.16±0.03	0.11±0.01	0.799	0.058	0.060
13	0.56±0.03	0.34±0.04	0.22±0.01	0.774	0.118	0.937
14	0.34±0.04	0.28±0.01	0.58±0.06	0.703	0.002	0.002
15	2.24±0.12	2.59±0.17	2.67±0.13	0.471	<0.0001	0.001
16	0.72±0.06	0.85±0.07	0.87±0.03	0.725	0.018	0.493
17	0.25±0.01	0.42±0.02	0.35±0.02	0.677	0.272	0.754
18	0.37±0.05	0.38±0.02	0.33±0.04	0.001	0.002	0.032

注: 表中各条带的磷酸化程度 (P/T) 以“平均值±标准差”来表示。

以上几种酶大多与糖酵解有关,肌肉中绝大多数酶都存在于肌浆中,而糖酵解酶占肌浆蛋白的三分之二。糖酵解速率由糖酵解酶的活性决定,有研究表明,宰后初期糖酵解酶活性的增强对肌肉成熟过程有重要影响^[4]。不管在体内还是体外,大部分糖酵解酶都可以被不同的激酶催化发生磷酸化反应,并且磷酸化反应会影响酶的活性或者稳定性。通过调控酶的活性,蛋白质磷酸化反应可以调控宰后肌肉糖酵解反应,进而影响肌肉的宰后僵直进程,对肉的嫩度具有决定性作用。因此,研究宰后肌浆蛋白质的磷酸化水平对于肉品质的调控具有重要作用。

2.4 不同嫩度羊肉中肌浆蛋白整体磷酸化水平随宰后成熟时间的变化

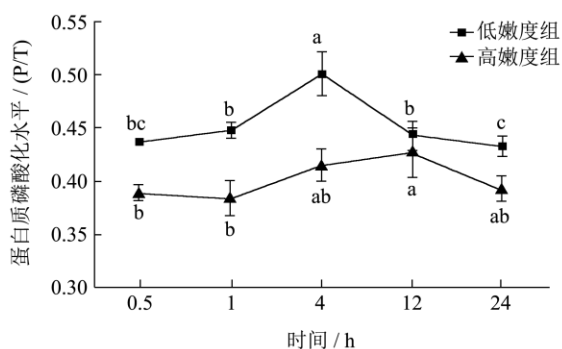


图3 不同嫩度羊肉中肌浆蛋白整体磷酸化水平比较

Fig.3 Comparison of global phosphorylation levels between two mutton groups with different degrees of tenderness

注:图中不同字母表示同一处理不同时间点差异显著($P < 0.05$)。

由图3可见,低嫩度组和高嫩度组的蛋白质磷酸化水平都是呈先上升后下降的趋势,其中低嫩度组的最高蛋白质磷酸化水平出现在宰后4h,高嫩度组的最高蛋白质磷酸化水平出现在宰后12h。宰后0.5h、1h、4h低嫩度组的肌浆蛋白整体磷酸化水平均显著高于高嫩度组($P < 0.05$)。肌浆蛋白整体磷酸化水平受嫩度、宰后成熟时间、以及嫩度和宰后成熟时间的交互作用影响显著($P < 0.05$)。

低嫩度组羊肉肌浆蛋白质磷酸化水平高于高嫩度组的原因可以从以下几方面分析:第一,根据D'Alessandro(2013)^[2],Li(2012)^[3]等人的“磷酸化诱导酶活降低”观点,磷酸化水平越高大多数糖酵解酶活性越低。实验结果显示,低嫩度组磷酸化水平较高,高嫩度组磷酸化水平较低,因此在磷酸化作用的影响下,高嫩度组糖酵解酶活性较高,糖酵解速率较快、pH较低,更有利于组织蛋白酶释放、激活,促进蛋白

质降解,进而有利于肉的嫩化^[15]。第二,Doumit等^[5]指出钙蛋白酶抑制蛋白会发生磷酸化反应,而钙蛋白酶抑制蛋白发生磷酸化反应后会增强对钙蛋白酶的抑制作用,减少钙蛋白酶对肌原纤维蛋白的降解,不利于肌肉的嫩化。第三,热休克蛋白27的磷酸化是其发挥保护肌动蛋白不被破坏作用的关键步骤^[16],本实验中低嫩度组热休克蛋白27磷酸化水平较高,而发生磷酸化的热休克蛋白27越多则有越多的肌动蛋白被保护,处于完整状态,不利于肌肉的嫩化。第四,肌肉收缩会增加磷酸果糖激酶的磷酸化水平^[12],低嫩度组的肉肌肉收缩程度剧烈,因此其磷酸果糖激酶的磷酸化水平高。

宰后初期肌浆蛋白的磷酸化水平处于升高的趋势,这可能是由于宰后肌肉糖酵解反应使肌肉pH下降,激酶处于较适宜pH,其活性增强,蛋白质磷酸化水平升高。而随后蛋白质磷酸化水平逐渐下降,可能是由于随着宰后时间延长肌肉内ATP、GTP被消耗,无法提供足够的磷酸基团发生磷酸化反应,使得磷酸化水平下降。

3 结论

肌浆蛋白质磷酸化水平受宰后成熟时间和嫩度的影响,其最高磷酸化水平出现于宰后4h或12h。肌浆蛋白质的整体磷酸化水平呈先上升后下降的趋势,低嫩度组羊肉的整体蛋白质磷酸化水平在宰后0.5h、1h、4h显著高于高嫩度组。蛋白质磷酸化水平通过影响酶活性和蛋白质结构稳定性而调控宰后肌肉僵直的进程,进而影响肌肉嫩度。进一步的研究可以分析蛋白质发生磷酸化后的结构变化及其影响肉品质的机理。

参考文献

- [1] Cohen P. The origins of protein phosphorylation [J]. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(5): E127-E130
- [2] D'Alessandro A, Zolla L. Meat science: from proteomics to integrated omics towards system biology [J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 78: 558-577
- [3] Li C B, Li J, Zhou G H, et al. Electrical stimulation affects metabolic enzyme phosphorylation, protease activation, and meat tenderization in beef [J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(5): 1638-1649
- [4] Stull T J, Kamm K E, Vandenboom R. Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 510: 120-128

- [5] Doumit M E, Bates R O. Regulation of pork water holding capacity, color, and tenderness by protein phosphorylation [R]. *Pork Quality*, 2000
- [6] NY/T 1180-2006.肉嫩度的测定-剪切力测定法[S]
- [7] Culler R D, F C Parrish Jr, G C Smith, et al. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle [J]. *J. Food Sci.*, 1978, 43: 1177
- [8] Lametsch R, Kristensen L, Larsen M R, et al. Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84: 918-924
- [9] Huang H G, Larsen M R, Lametsch R. Changes in phosphorylation of myofibrillar proteins during postmortem development of porcine muscle [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(3): 1999-2006
- [10] Huang H G, Larsen M R, Karlsson A H, et al. Gel-based phosphoproteomics analysis of sarcoplasmic proteins in postmortem porcine muscle with pH decline rate and time differences [J]. *Proteomics*, 2011, 11(20): 4063-4076
- [11] 王思丹,李春保,温思颖,等.禁食处理和宰后时间对鸡肉蛋白磷酸化水平的影响[J].*食品科学*,2013,34(19):270-274
WANG Si-dang, LI Chun-bao, WEN Si-ying, et al. Effect of fasting and postmortem time on protein phosphorylation of chicken muscle [J]. *Food Science*, 2013, 34(19): 270-274
- [12] Luther M A, Lee J C. The role of phosphorylation in the interaction of rabbit muscle phosphofructokinase with F-actin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(4): 1753-1759
- [13] Bolten K E, Marsh A E, Reed S M, et al. Sarcocystis neurona: molecular characterization of enolase domain 1 region and a comparison to other protozoa [J]. *Experimental Parasitology*, 2008, 20(1): 108-112
- [14] Shen Q W, Underwood K R, Means W J, et al. The halothane gene, energy metabolism, adenosine monophosphate-activated protein kinase, and glycolysis in postmortem pig longissimus dorsi muscle [J]. *Anim. Sci.*, 2007, 85: 1054-1061
- [15] 夏安琪,李欣,陈丽,等.不同宰前运输时间对羊肉品质的影响[J].*现代食品科技*,2014,30(9):230-235
XIA An-qi, LI Xin, CHEN Li, et al. Effect of pre-slaughter transport time on lamb quality [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(9): 230-235
- [16] Loktionova S A, Kabakov A E. Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells [J]. *FEBS Lett.*, 1998, 433: 294-300