

氯化钙注射对鹅肉成熟机制及品质影响的研究

周昌瑜, 楼宵玮, 杜筱婧, 杨阳, 曹锦轩, 潘道东, 孙杨赢

(宁波大学海洋学院, 浙江省动物蛋白精深加工重点实验室, 浙江宁波 315211)

摘要: 为了探究氯化钙溶液注射对鹅肉骨骼肌组织嫩化机制和保水性的影响, 本文以浙东白鹅为研究对象, 分析了鹅肉宰后储存过程中, 钙蛋白酶和凋亡酶3的活性, 肌原纤维蛋白的降解程度和二级结构含量的变化, 以及测定了鹅肉的剪切力值和蒸煮损失率。研究表明, 与对照组相比, 150 mM 氯化钙处理后显著提高了 calpain 和 caspase3 活力, 加速了肌原纤维蛋白的降解, 有效降低鹅肉的剪切力值, 但蒸煮损失率略大于对照组。拉曼光谱分析肌原纤维蛋白二级结构含量显示, 150 mM 氯化钙处理导致肌原纤维蛋白 α -螺旋逐渐转变为无规则卷曲 ($p < 0.01$), 而注水处理和对照组肌原纤维蛋白 α -螺旋则转变为 β -折叠。氯化钙的注射浓度由 150 mM 增加至 300 mM 时, calpain 和 caspase3 的活性未明显增强, 鹅肉的剪切力值并未显著下降 ($p > 0.05$), 不能有效改善鹅肉的嫩度。

关键词: 氯化钙注射; 肌原纤维蛋白; 二级结构; 钙激活酶; 凋亡酶3; 嫩度; 蒸煮损失率

文章编号: 1673-9078(2016)10-151-159

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.024

Effects of Calcium Chloride Injection on the Aging Mechanism and the Quality of Goose Meat

ZHOU Chang-yu, LOU Xiao-wei, DU Xiao-jing, YANG Yang, CAO Jin-xuan, PAN Dao-dong, SUN Yang-ying

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Key Laboratory of Animal Protein Food Deep Processing Technology of Zhejiang Province, Ningbo 315211, China)

Abstracts: In order to study the effects of calcium chloride injection on tenderness and water-holding capacity of goose skeletal muscle, Zhejiang white goose meat was used in this paper. The changes in calpain and caspase 3 activities, the degree of degradation, and the secondary structure content of myofibrillar proteins during the postmortem storage of goose meat were analyzed. The shear force value and the cooking loss of the goose meat were also measured. The results showed that, compared with the control group, the group with 150 mM calcium chloride had higher calpain and caspase 3 activities, which accelerated the degradation of myofibrillar protein and significantly reduced the shear force value of the goose meat, but slightly increased the cooking loss. Raman spectroscopy was adopted to analyze the secondary structure content of myofibrillar protein. The results showed that 150 mM calcium chloride treatment caused the gradual transformation of myofibrillar protein alpha helices to random coils ($p < 0.01$), and the myofibrillar protein alpha helices were transformed into β -sheets in the control and water injection groups. While the concentration of the calcium chloride increased from 150 mM to 300 mM, the activities of calpain and caspase3 did not increase apparently, the shear force value of goose meat did not decreased significantly ($p > 0.05$), and the goose meat tenderness was not effectively improved.

Key words: calcium chloride injection; myofibrillar proteins; secondary structure; calpain; caspase 3; tenderness; cooking loss

嫩度是衡量肉产品最重要的食用品质之一, 也是消费者选购肉产品的重要指标。研究发现, 肉产品的食用品质受到多种因素的影响例如物种、性别、年龄、饲养条件及宰后成熟时间等^[1]。具有高食用品质的肉

收稿日期: 2015-12-13

基金项目: 宁波市创新团队 (2012B82017); 国家农业科技成果转化资金项目 (2013GB2C200191); 国家自然科学基金资助项目 (31471681)

作者简介: 周昌瑜 (1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工与质量控制

通讯作者: 曹锦轩 (1982-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 畜产品加工与质量控制

产品是当今的消费趋势, 因此提高肉产品附加值, 改善肉产品品质是肉类工业的研究重点。良好食用品质的肉类大多需要经历宰后胴体分割和冷藏成熟, 成熟是肉类工业推崇提高肉品嫩度的重要途径^[2]。目前大多关于肉类品质的研究集中于饲养的类型、宰后成熟对肌肉组织和肌原纤维蛋白结构的影响^[1]。此外, 国内外科研工作者还围绕动物屠宰后的生理环境改变对品质的影响开展了一系列的研究。研究表明, 动物屠宰后, 缺血缺氧, 能量迅速耗尽, 钙离子泵作用消失并释放至胞浆, 激活内源酶引起肌肉组织发生降解性溃散^[3], 从而提高肉品的嫩度; 这些研究无疑丰富了

肉品自然成熟机制研究的理论宝库,但目前的研究还不能充分揭示外源注射对肉品品质的影响。外源注射氯化钙是加快肉品成熟的主要途径,氯化钙注射对肉品嫩度和保水性影响的相关的报道较少,其作用机制仍未被完全理解,因此进一步探究氯化钙注射对肉品品质的影响十分有必要。

氯化钙注射是缩短肌肉组织自然成熟时间的有效方式,相关的研究已在猪、牛、羊肉中得到开展。Bolema 等对牛肉的半膜肌研究发现注射氯化钙能有效降低牛肉的剪切力值和有效阻止肉的水分流失。Koochmaria 等报道了,注射 0.3 M CaCl_2 的羊肉剪切力值显著下降,成熟时间明显缩短。Rees 等^[4]研究猪肉嫩度变化时表明, CaCl_2 注射使得猪肉具有更好嫩度的原因是,钙离子注射使肌肉组织的胞浆内钙离子浓度明显增加,激活了内源蛋白酶中钙蛋白酶,促进了肌原纤维蛋白的降解。然而新的研究指出,钙离子释放至胞浆也提高了凋亡酶的活性。Kemp, Bardsley 等^[5]指出,凋亡酶在不同类型的骨骼肌细胞的表达水平与肌肉组织的嫩度变化有密切联系。Chowdhury 和 Tharakan 等^[6],指出凋亡酶 3 是凋亡酶家系中最重要酶,它是动物宰后降解肌原纤维蛋白的关键酶。Kemp 和 Parr 等^[7]研究牛肉嫩度时发现牛肉宰后初期凋亡酶 3 有极强的活性并能降解肌原纤维蛋白和降低牛肉的剪切力值。上述的研究表明, CaCl_2 注射有效缩短肉品的宰后成熟时间和提高肉品食用品质的可接受性,但 CaCl_2 注射对鹅肉宰后这些酶活性的影响缺乏相应的研究。

FAO 数据显示,我国是世界上活鹅养殖最多的国家,但我国的鹅肉加工产品目前仍以白条鹅、初级中式加工产品和冻鲜鹅为主,产品附加值低,市场需求越来越受到限制。改善鹅肉品质,提高市场竞争力是亟需解决的科学问题。研究宰后鹅肉成熟机制是获得最佳鹅肉嫩度的有效方式。宰后注射氯化钙对鹅肉的肌肉组织内源酶特别是钙蛋白酶、凋亡酶和肌原纤维蛋白结构的改变有怎样的影响,仍旧不清楚,弄清楚这些问题有利于突破当前的鹅肉加工的瓶颈,实现鹅肉加工产业现代化。鉴于此,本文建立了氯化钙与浙东白鹅作用体系,利用凝胶电泳、拉曼光谱等技术研究了鹅肉组织注射氯化钙溶液后,酶活性、肌原纤维蛋白结构及品质变化,旨在阐明氯化钙对鹅肉成熟的影响机制,提高鹅肉的食用品质。

1 材料与方法

1.1 试验原料及取样

选用日龄为 60 d 左右的浙东白鹅 16 只,由浙江宁波市镇海区江南家禽育种有限责任公司提供,经宰杀放血后,去除脂肪及结缔组织后迅速取其胸肉,将宰后的鹅胸肉切成小块,并随机均分成四组。其中一组不进行注射处理作为对照,另外三组分别按肉重的 10% 注射去离子水、150 mM CaCl_2 、300 mM CaCl_2 。将不同注射处理后的鹅肉样品包装并置于 4 °C 成熟,分别选取储藏 12 h、36 h、72 h、120 h 的鹅肉作为分析的取样点,将取好的样品一部分样品进行鹅肉品质分析,一部分液氮冷冻后置于 -80 °C 保藏用于后续的酶活性和蛋白结构分析,四个处理组的相应指标的分析分别做五次重复。

1.2 实验试剂与设备

1.2.1 实验试剂

牛血清白蛋白、氯化钾、氯化钙、硫酸镁、羟乙基哌嗪乙硫磺酸、乙二醇四乙酸、二硫苏糖醇等均为分析纯,Ac-DEVD-AFC、Suc-LLVY-AMC,均由 Bioquest 公司提供。

1.2.2 主要设备

Tecan M200 酶标仪 (Austria); 电泳仪 (北京六一); inVia-Reflex 拉曼光谱仪 (Renishaw)。

1.3 指标分析

1.3.1 钙蛋白酶(calpain)的提取

酶液的提取参考 Toldra 等^[8]的方法,稍作修改。具体操作如下,准确称取 1.0 g 鹅肉样品于 50 mL 离心管,加入 3.0 mL、50 mM Tris 缓冲液 (pH 8.5),高速匀浆机 10000 r/min 冰浴匀浆 3 次、每次 10 s,将匀浆后的溶液于 4 °C、12000 g 离心 20 min,将所得上清液过滤后调整溶液 pH 至 7.5,保存其清液用于酶活性分析。

1.3.2 凋亡酶 3 (caspase3) 的提取

酶液的提取参考 Cao 等^[9]的方法,稍作修改。具体操作如下,准确称取 1.00 g 鹅肉样品于 50 mL 离心管,加入 2.5 mL 凋亡酶提取液 (pH 7.5),于高速浆机 10000 r/min 冰浴匀浆 3 次、每次 10 s,将匀浆后的溶液于 4 °C、18000 g 离心 30 min,将所得上清液过滤后保存其清液用于酶活性分析。

1.3.3 钙蛋白酶活性分析

参考 Soh, Song 等^[10]的研究方法稍作修改。具体操作如下, Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC) 作为分析钙蛋白酶活性变化的底物,50 μL 酶提取物加入到 96 孔酶标板中,然后加入 250 μL 反应液,反应液 (pH 7.5) 组成为 100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 0.05 mM Suc-LLVY-

AMC。上述加样混合物于 37 °C 孵育 1 h，孵育后的混合物用酶标仪测定其荧光值，测定条件为激发波长 355 nm，发射波长 460 nm。钙蛋白酶的活力单位定义为每毫克蛋白在 37 °C 下的荧光强度。

1.3.4 凋亡酶 3 活性分析

参考 Cao 等^[9]的方法并稍作修改。Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) 作为分析凋亡酶 3 活性变化的底物，50 μL 酶提取物加入到 96 孔酶标板中，然后加入 250 μL 酶分析液，分析液 (pH 7.5) 组成为 50 mM HEPES、25 μM Ac-DEVD-AMC、10 mM DTT、0.1% CHAPS、10% 蔗糖。上述加样混合物于 37 °C 孵育 1 h，孵育后的混合物用酶标仪测定其荧光值，测定条件为激发波长 360 nm，发射波长 460 nm。凋亡酶 3 的活力单位定义每毫克蛋白在 37 °C 下的荧光强度。

1.3.5 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

肌原纤维蛋白的提取参考 Cao 和 Jiang 等^[11]的方法稍作修改，准确称取 1 g 肌肉样品于 50 mL 离心管中加入 20 mL、50 mM 的预冷磷酸缓冲液 (pH 7.5)，12000 r/min 冰浴匀浆 3 次、每次 10 s，将所得混合液于 4 °C、5000 g 离心 15 min，收集沉淀重复上述步骤 3 次，将最后所得沉淀溶解于 5 mL、50 mM 含有 0.5 M NaCl 的预冷磷酸缓冲液 (pH 8.0)，将所得混合液于 4 °C、3000 g 离心 15 min，收集上清液，即为肌原纤维蛋白溶液，利用 BCA 试剂盒调整蛋白浓度，使得肌原纤维蛋白浓度为 5 mg/mL。

制备 12.5% 的分离胶、5% 浓缩，每个泳道上样量为 10 μL，电泳结束后考马斯亮蓝 R-250 染色液着色 30 min，脱色液脱色直至凝胶上蛋白条带清晰，凝胶成形系统拍照，分析蛋白变化。

1.3.6 拉曼光谱分析肌原纤维蛋白二级结构

选用 785 nm 离子激光器，功率为 140 mW，曝光时间 10 s，用 20 倍长聚焦镜头将激光聚焦于载玻片上的肉样，扫描 3 次，获取 600~1800 cm⁻¹ 范围的拉曼光谱。以苯丙氨酸的单基取代苯基环在 1002 cm⁻¹ 伸缩振动强度作为内标进行归一化，用 Labspec 5 软件对图谱进行平滑和基线校正，peak fit 软件对肌原纤维蛋白的酰胺 I 带进行分峰。

1.3.7 剪切力值的测定

参考 Cao 等^[9]的方法稍作修改，取其待测鹅肉样品沿肌纤维方向切成大小约为 2.0×1.0×0.5 cm 的肉条，置于 4 °C 冰箱保存待测，用肌肉嫩度仪垂直肌纤维方向剪切肉条，同一取样点取 5 条平行肉样，每个肉样剪切 3 次，肉样的最终切力值 (Kgf) 表示为 5 个平

行样的剪切力的平均值。

1.3.8 蒸煮损失率的测定

参考 Schönfeldt 和 Strydom 等^[12]的方法稍作修改，取大小约为 (2.5 cm×2.5 cm×4 cm) 的肉样，准确称重肉样 (m₁) 精确到 0.1 mg，密封后置于 85 °C 水浴锅中，当肉样中心温度到达 75 °C 时保持 20 min。蒸煮完成后，迅速在流水中冷却到室温，用吸水纸吸干表面水分，再次准确称重 (m₂)。每组样品 5 次平行，每个平行做三次重复，按以下公式计算蒸煮损失率。

$$\text{蒸煮损失率 (\%)} = (m_1 - m_2) / m_1 \times 100$$

1.3.9 数据统计与分析

鹅肉宰后成熟过程中不同处理对钙蛋白酶、凋亡酶活性、剪切力值、蒸煮损失率等是否有显著变化，采用 SAS 8.0 中 one-way ANOVA 的 Duncan's Multiple Range Test 模型进行统计学分析，差异显著性水平 $p < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 凋亡酶 3 活性变化

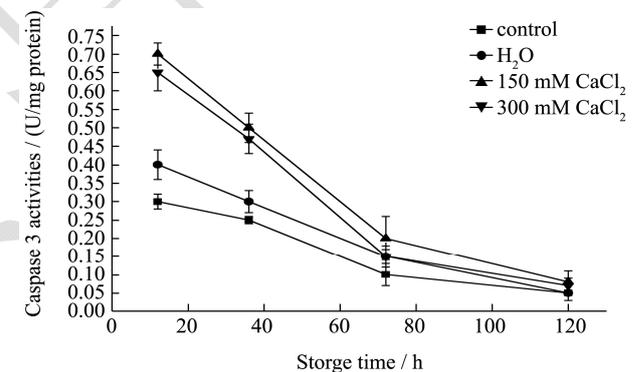


图 1 成熟过程中凋亡酶 3 的活性变化

Fig.1 Changes in caspase 3 activity during the ageing process

不同注射处理对鹅肉宰后骨骼肌细胞内 caspase 3 酶的活性影响如图 1 所示。图 1 显示，成熟时间由 12 h 至 120 h，四个组 caspase3 活性都逐渐降低，成熟 120 h 时所有处理组 caspase3 的活性值降到最低，此时对照组、注水组、150 mM CaCl₂ 组、300 mM CaCl₂ 组的 caspase3 活性值分别为 0.06 U、0.06 U、0.08 U、0.08 U，处理组之间的 caspase3 酶活性值无显著差异 ($p > 0.05$)。鹅肉成熟过程中，成熟时间由 12 h 至 24 h，150 mM CaCl₂ 处理组的 caspase3 活性急剧下降 ($p < 0.01$)，300 mM CaCl₂ 处理组的 caspase3 活性与 150 mM CaCl₂ 处理组的 caspase3 活性无显著差异，但明显高于注水处理和对照组的 caspase3 活性值；宰后成熟时间由 72 h 至 120 h 时，150 mM 和 300 mM CaCl₂ 处理组的 caspase3 活性略有下降，此时，四个处理组

的 caspase3 活性值无显著差异。整个成熟过程中, 150 mM 和 300 mM CaCl_2 处理组 caspase3 活性具有相似的变化, 且在同一时间点, 两个处理组之间的 caspase3 酶活性值无明显差异 ($p>0.05$)。

动物屠宰后, 肌肉转变成具有良好食用品质的肉的过程受到多种因子的调节。先前的研究指出, 肌肉品质的改善主要是由于动物屠宰后在蛋白酶的作用下, 肌原纤维蛋白发生降解, 肌肉组织溃散使得肌肉的嫩度等品质得到改善。屠宰后的骨骼肌细胞生理环境发生了变化, 例如缺血、缺氧; 这些条件的改变会促使骨骼肌细胞开启细胞死亡途径, 激活了 caspase3。Huang 等^[13]指出, caspase3 是动物屠宰后具有较强活性的半胱氨酸蛋白酶, 并研究证明它对鸡肉肌原纤维蛋白有明显的降解的作用。Koothmarai 也报道, caspase3 能有效降解肌原纤维蛋白中的肌间线蛋白 (desmin)、肌钙蛋白-T (troponin-T)、肌联蛋白 (titin) 等。这些研究表明, caspase3 在动物宰后降解肌原纤维蛋白起着至关重要的作用。

Chen 和 Feng 等^[14]对鸡肉组织内 caspase3 研究时发现, 宰后 24 h 内 caspase3 活性极显著降低, 24 h 后 caspase3 活性无显著变化。Kemp 等^[5]对宰后猪最长肌 caspase3 活性变化研究发现, 宰后 caspase3 活性逐渐降低, 在宰后 32 h 和 192 h 时显著降低。我们的研究结果显示, caspase3 活性也呈现下降趋势, 特别在宰后 12 h 至 72 h, 鹅肉骨骼肌细胞内 caspase3 活性极显著下降; 然而在成熟 120 h, 我们所测得的 caspase 酶活性值, 低于其他研究者对 caspase3 活性的报道, 这可能是由于不同物种内 caspase3 的表达量不同, 导致其活性有所不同。Chen 等^[14]采用 Ca^{2+} 注射鸡肉组织也发现, 与对照组相比, Ca^{2+} 注射组 caspase3 的活性更强。Sergeev 等报道了, 外源注射增加细胞内 Ca^{2+} 浓度, 激活了与 Ca^{2+} 有关的 caspase3 酶作用通路。Twiner、Chidiac 和 Dixon 等^[15]也表明, 利用有机化合物刺激增加细胞了 Ca^{2+} 浓度, 加速了细胞程序性凋亡。在我们的报道中, 宰后 12 h 到 72 h 时, CaCl_2 注射处理组 caspase3 有更高的活性, 可能是由于外源注射氯化钙, 增加了细胞内 Ca^{2+} 浓度, 激活了 caspase3, 使得其酶活性增强。

2.2 calpain 作用分析

四种不同处理对鹅肉骨骼肌细胞内 calpain 活性影响如图 2 所示。图 2 显示, 在 12 h~120 h 成熟时间内, 四个处理组 calpain 活性都显著降低, 150 mM 和 300 mM CaCl_2 处理组的 calpain 活性显著高于注水和对照组的 calpain 活性, 直至成熟 120 h 时, 处理组之

间的 calpain 活性无显著差异 ($p>0.05$)。成熟过程中, 150 mM calpain 活性值由 12 h 的 39.52 U 下降至 120 h 的 18.12 U ($p<0.001$), 300 mM CaCl_2 处理组的 calpain 值由 12 h 的 39.63 U 下降至 120 h 的 18.40 U ($p<0.001$); 而对照组和注水处理组的 calpain 活性值分别由 12 h 的 30.02 U、31.08 U 显著下降至 120 h 的 18.81 U ($p<0.001$)、19.10 U ($p<0.001$)。

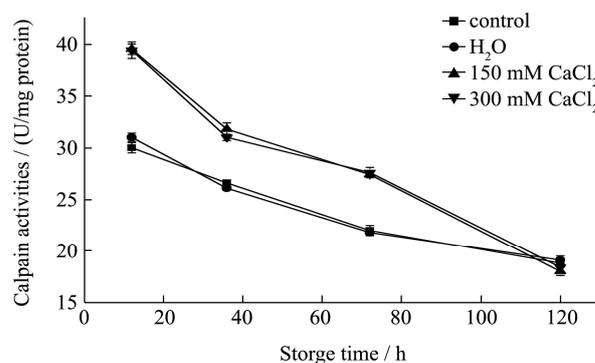


图 2 成熟过程中钙蛋白酶活性变化

Fig.2 Changes in calpain activity during the ageing process

Calpain 是动物宰后成熟过程中降解肌原纤维蛋白的主要内源酶之一, 肌原纤维蛋白的降解使得肉品的嫩度得到改善, 因此学术界认为 calpain 对改善肉品的嫩度起着关键作用。Hopkins 和 Koothmarai 等^[16,17]指出 calpain 是肉产品成熟过程中, 降解肌原纤维蛋白改善嫩度的关键酶。Koothmarai 等指出增加细胞内 Ca^{2+} 浓度能改善肉品的嫩度, 并指出, 肌肉成熟过程中, Ca^{2+} 激活 calpain, 使得肌原纤维蛋白具有更大的降解度。Melody、Lonergan 和 Rowe 等表明, 动物屠宰后 calpain 出现的自溶片段, 是 calpain 活性表现形式。Pomponio 等^[18]在研究宰后猪肌肉成熟过程中 calpain 活性变化时指出, 肌浆网内的 Ca^{2+} 首先激活 μ -calpain 然后激活 m-calpain, 二者的激活对降解肌原纤维蛋白有重要作用。Geesink、Taylor 和 Bekhit 等研究羊肉胞浆内 Ca^{2+} 水平变化时发现, 宰后羊肉最长肌的 Ca^{2+} 从宰后 1 d 时的 106 μM 增加至 7 d 时的 189 μM 。 Ca^{2+} 激活 calpain 的过程, 是 calpain 降解肌原纤维蛋白的关键步骤; 动物屠宰后胞浆内 Ca^{2+} 浓度增加, 达到激活 calpain 的关键浓度使得 calpain 活性增强。黄明对宰后牛肉品质研究时发现, 加入 100 μM 的 Ca^{2+} 和 calpain 同时存在时, 肌原纤维蛋白降解, 而仅有 Ca^{2+} 时肌原纤维蛋白未发生降解, 这表明 Ca^{2+} 促进了 calpain 对肌原纤维蛋白的降解作用。我们的实验结果显示, 150 mM 和 300 mM CaCl_2 处理都对 calpain 有激活作用, 但注射氯化钙的浓度由 150 mM 增至 300 mM 时 calpain 活性并未增强, 这可能是 150 mM 的 Ca^{2+} 足够激活 calpain; 在整个成熟时间范围内, calpain 的活性逐渐降低, 直至四个

处理组的calpain活性无显著差异, calpain活性的降低可能是由于calpain激活后发生自溶, 使得calpain活性片段逐渐减少。Pomponio和Ertbjerg等^[19]对猪肉最长肌calpain活性研究时指出宰后成熟过程中calpain酶活性逐渐降低, 并进一步指出, calpain酶活性降低是由于calpain发生了自溶。这些报道与我们对成熟过程中鹅肉的calpain活性研究具有相似性。

2.3 肌原纤维蛋白降解

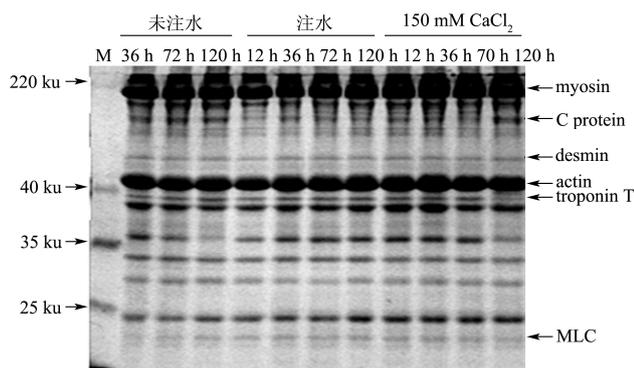


图3 成熟过程中肌原纤维蛋白变化凝胶电泳图

Fig.3 Electrophoresis result of changes in the myofibrillar proteins during the ageing process

鹅肉宰后肌原纤维蛋白的变化如图3所示。SDS-PAGE凝胶电泳图显示, 储藏时间由12h至120h, 肌球蛋白、肌动蛋白和肌间线蛋白等蛋白未观察到明显的降解, C蛋白、肌钙蛋白-T和肌球蛋白轻链(MLC)都明显降解; 92~68 ku和32~24 ku区间有大量的蛋白条带出现。150 mM CaCl₂处理组C蛋白和肌钙蛋白-T的降解度明显大于对照组和注水处理组, 成熟120h, 150 mM CaCl₂处理组的C蛋白和肌钙蛋白-T条带消失。

肌原纤维蛋白在内源酶的作用下降解为小分子的蛋白或多肽, 肌肉组织溃散, 从而肉品嫩度得到改善。肌钙蛋白、C蛋白、肌球蛋白轻链、肌间线蛋白等蛋白已在肌原纤维蛋白降解中已被识别出, 并把这些蛋白的降解作为肉品嫩度得到改善的重要指标。Taylor等表明, 肌间线蛋白的降解程度与肉品的嫩度的提高有着紧密的相关性。Harris等对宰后牛肉品质变化的研究时报道了, 肌钙蛋白-T被降解为30 ku和28 ku的蛋白, 并指出, 30 ku的蛋白的出现是肉品嫩度得到改善的标志。Lawrence等对宰后牛肉注射不同浓度的Ca²⁺后发现100 mM Ca²⁺处理组, 肌钙蛋白-T明显被降解为30 ku和28 ku的蛋白。在我们的试验结果中, 150 mM CaCl₂注射组的肌钙蛋白-T的降解度大于注水处理组和对照组。这表明注射150 mM Ca²⁺促进了肌钙蛋白-T的降解, 肌钙蛋白-T的降解度增大的原因可能是胞浆

内Ca²⁺水平氯化钙注射后, 激活了内源酶, 肌钙蛋白-T在高活性的内源酶作用下发生强烈的降解。我们对肌钙蛋白-T的报道与Lawrence等对宰后牛肉中肌钙蛋白-T的研究具有一致性。我们的实验结果还显示, 150 mM CaCl₂注射成熟时, 肌球蛋白轻链(MLC)和C蛋白也发生了降解, 在成熟120h时C蛋白几乎完全降解, 而此时在对照组和注水处理组仍能观察到C蛋白的清晰条带。Wang等^[20]对鸭肉肌原纤维蛋白的研究发现C蛋白也发生了降解。这与我们的报道具有一致性。Lonergan等^[21]也指出肌球蛋白和肌动蛋白在动物屠宰后不易发生降解。我们的研究中未观察到肌球蛋白、肌动蛋白、肌间线蛋白的明显降解。但Taylor等报道了动物宰后在成熟过程中肌间线蛋白会发生明显的降解, Huang等^[13]对鸡肉肌原纤维蛋白的研究也发现肌间线蛋白发生了明显的降解。Veiseth等对羊肉嫩度的研究指出, 宰后10 d后肌间线蛋白的降解显著增加。我们对鹅肉宰后肌原纤维蛋白的研究未发现肌间线蛋白有明显降解, 这很可能是由于鹅肉的成熟时间相对较短, 从而未能观察到肌间线蛋白的降解。

2.4 蒸煮损失率变化

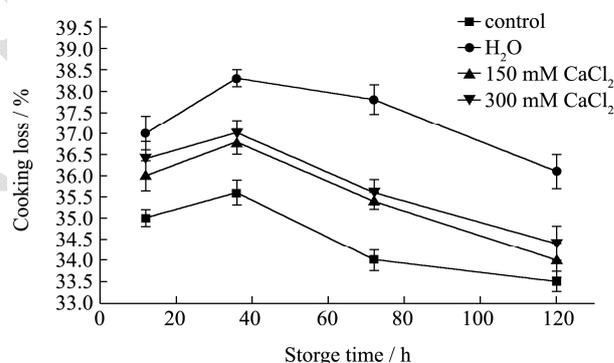


图4 成熟过程中蒸煮损失率变化

Fig.4 Changes in the cooking loss during the ageing process

鹅肉宰后成熟过程中蒸煮损失率变化如图4所示, 鹅肉成熟过程中, 四组的蒸煮损失率具有相似的变化趋势, 但在不同的成熟时间点各组蒸煮损失率不相同。图4显示, 成熟时间由12h至36h, 四个处理组鹅肉的蒸煮损失率都显著增大, 注水处理组的蒸煮损失率显著大于150 mM CaCl₂注射组、300 mM CaCl₂注射组和对照组, 150 mM CaCl₂注射组和300 mM CaCl₂注射组鹅肉的蒸煮损失率无显著差异($p>0.05$); 成熟时间由36h至120h, 四个组的蒸煮损失率都显著降低, 对照组的蒸煮损失率由35.60%降低至33.50%($p<0.01$); 150 mM CaCl₂注射组、300 mM CaCl₂注射组分别由36.80%、37.00%降低至34.00%、34.40%($p<0.05$, $p<0.05$); 注水处理组由38.30%降低

到 36.10% ($p < 0.05$); 120 h, 对照组、150 mM CaCl_2 注射组和 300 mM CaCl_2 注射组蒸煮损失率无显著差异 ($p > 0.05$), 然而, 注水处理组和 150 mM CaCl_2 注射组蒸煮损失率差异显著 ($p < 0.01$)。

蒸煮损失率是评价肉品在成熟过程中保水性的重要指标, 也是衡量肉品品质的重要方法。先前的研究展示, 宰后的肌肉在成熟过程中, 肌肉的品质逐步得到改善, 保水性也随之变化。Kim 等对牛肉保水性的研究发现, 成熟的早期, 肌肉的蒸煮损失率逐渐增大。Yuan 等对宰后牛里脊肉研究发现, 宰后成熟 3 周内, 牛肉的蒸煮损失率也逐渐增加。然而 Suliman 等^[22]对注射 CaCl_2 的骆驼肌肉研究发现, 注射 CaCl_2 溶液的骆驼肌肉蒸煮损失率在成熟过程中无显著变化。我们对鹅肉的蒸煮损失率研究发现, CaCl_2 注射组的鹅肉蒸煮损失率先增加后降低。Klinhom 等也研究发现 CaCl_2 注射处理组和对照组相比, CaCl_2 注射处理组有更高的蒸煮损失率。他们的报道与我们的实验结果相一致, 然而不同 Suliman 等对骆驼肌肉蒸煮损失率的研究, 这可能是由于骆驼肌肉的肌原纤维种类及其结缔组织含量不同于鹅肉, 使得其蒸煮损失率不同于鹅肉。研究表明, 物种的差异, 同一物种内肌肉的结构, 特别是连接组织的含量都是影响蒸煮损失率变化的重要因素。Klinhom 等^[23]对牛肉的蒸煮损失率的研究时指出, 连接组织中的胶原质在成熟过程中会形成具有强收缩力的三维网状结构, 这些结构的形成可能阻止蛋白的延展, 从而减少蛋白与自由水作用的表面。Miller 等也指出, 胶原质形成的三维网状结构是蛋白表面吸附自由水的阻碍因子。我们的研究还发现, CaCl_2 注射处理组蒸煮损失率显著低于注水处理组。与注水处理组的蒸煮损失率相比, CaCl_2 注射处理组有更低的蒸煮损失率可能是 Ca^{2+} 的作用改变了肌原纤维蛋白与自由水结合的表面构象。Lawrence 等指出, 肌原纤维蛋白中添加钙盐增加了 Ca^{2+} 与肌原纤维蛋白作用的强度, 使得蛋白表面吸附自由水的能力增强。

2.5 剪切力值变化

鹅肉宰后成熟过程中, 四个处理组剪切力值如图 5 所示。图 5 展示, 鹅肉成熟过程中, 四个组的剪切力值都显著降低。成熟时间由 12 h 至 120 h, 注水处理组剪切力值由 5.10 Kgf 降低至 4.23 Kgf ($p < 0.05$), 对照组剪切力值由 5.20 Kgf 降低至 4.30 Kgf ($p < 0.05$); 150 mM CaCl_2 注射组和 300 mM CaCl_2 注射组的剪切力值具有相同的变化趋势, 150 mM CaCl_2 注射组的剪切力值由 4.90 Kgf 降低至 2.50 Kgf ($p < 0.001$), 300 mM CaCl_2 注射组的剪切力值由 4.80 Kgf 降低至 2.45 Kgf

($p < 0.001$)。12 h 至 36 h, 150 mM CaCl_2 注射组和对照组的剪切力值无显著变化 ($p > 0.05$); 36 h 至 120 h, 与对照组的剪切力值相比, 150 mM CaCl_2 注射组有更低的剪切力值 ($p < 0.01$)。

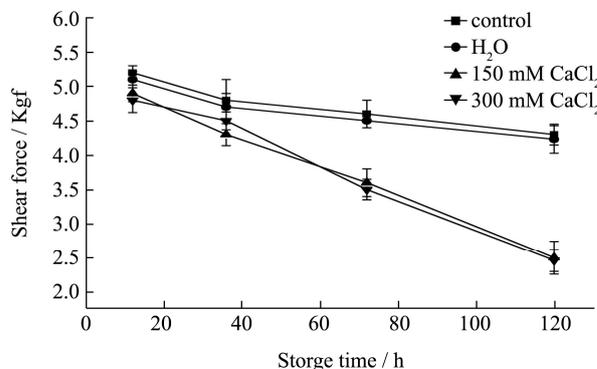


图 5 鹅肉成熟中剪切力值变化

Fig.5 Changes in the shear force value during the ageing process

嫩度是消费者选购肉产品的关键因素, 也是衡量肉品品质的重要参数。研究表明, 动物宰杀后注射氯化钙能有效改善肌肉的嫩度, 降低肌肉的剪切力值, 从而获得更好食用品质。Kong、Diao和Xiong等^[24]报道对宰后中国黄牛牛肉注射 300 mM CaCl_2 能有效提高牛肉的嫩度。Boleman 等报道了牛肉注射 CaCl_2 12 h 后, 牛肉的剪切力显著下降, 嫩度明显增加, 作者还指出宰后 1 h 注射氯化钙溶液比宰后 12 h 和 24 h 注射更能有效降低牛肉的剪切力值。我们的实验结果也显示, 氯化钙注射组有更低的剪切力值。Wheeler 等研究发现, 分别向宰后牛肉注射 200 mM 和 250 mM CaCl_2 成熟 7 d 时, 两处理组的剪切力值都显著下降, 并指出注射不同浓度的氯化钙, 牛肉的剪切力值不相同。Cao 等^[9]报道了注射 300 mM CaCl_2 , 在成熟 3 d 时, 与未注射氯化钙组相比, 两个处理组之间的剪切力值无显著差异; 成熟 7 d 时, 300 mM CaCl_2 处理组有更低的剪切力值。我们的对鹅肉的研究也发现, 在成熟 12 h 至 36 h, 注射 150 mM CaCl_2 和 300 mM CaCl_2 处理组与对照组和注水处理组的剪切力值相比无明显差异; 成熟 120 h, CaCl_2 处理组的剪切力值显著低于对照组和注水处理组。36 h 至 120 h, CaCl_2 注射组剪切力明显降低, 可能是注射氯化钙后提高了胞浆内 Ca^{2+} 浓度, 激活了内源酶特别是 calpain 和 caspase 酶, 增强了 calpain 和 caspase 酶活性, 从而促进了 calpain 和 caspase 酶对 Z 盘附近的肌原纤维蛋白的连接蛋白的降解, 使得肌肉组织溃散, 细胞骨架降解, 降低了肌肉的剪切力值, 提高了肌肉的嫩度。

2.6 肌原纤维蛋白二级结构含量变化

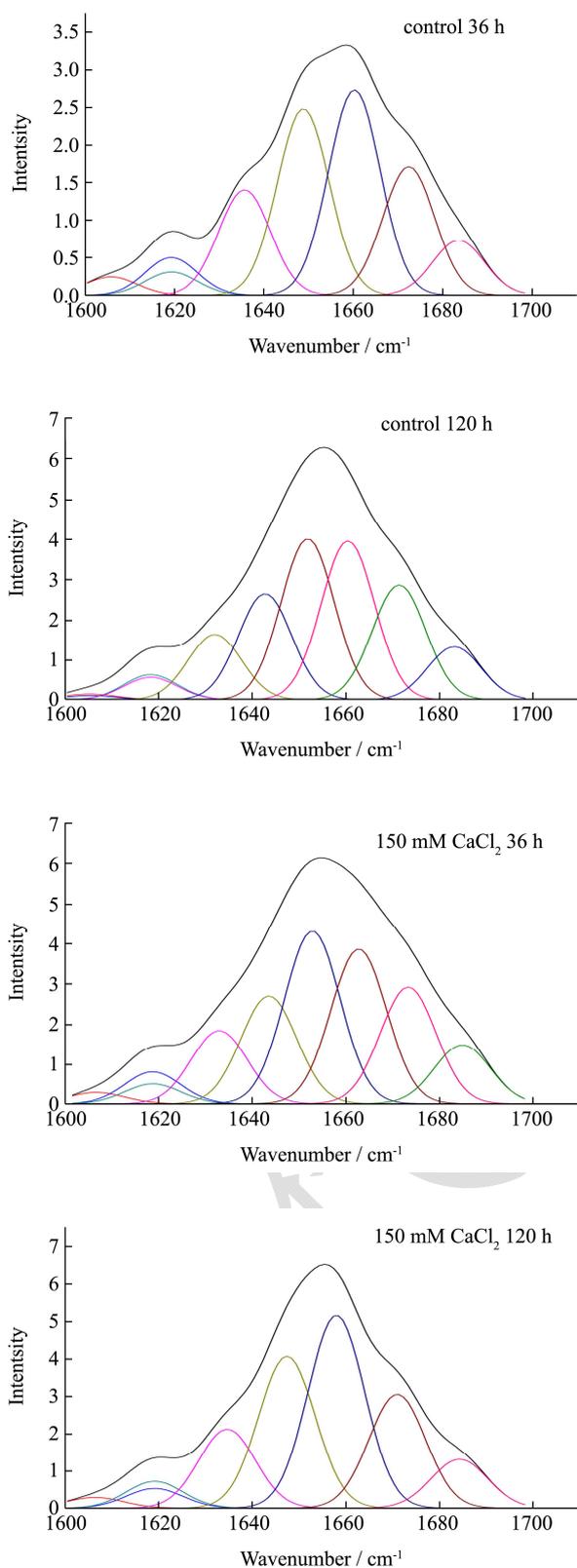


图6 成熟过程中肌原纤维蛋白的拉曼光谱拟合曲线图

Fig.6 Deconvoluted and curve-fitted Raman bands of amide I of myofibril proteins during the ageing process
鹅肉宰后成熟过程中，四种不同处理后肌原纤维

蛋白的酰胺 I 带的变化的傅里叶去卷积和曲线拟合图如图8所示；肌原纤维蛋白二级结构的含量变化如表1所示。成熟12 h时，四个组肌原纤维蛋白二级结构的含量最多是 α -螺旋、其次是 β -折叠。成熟36~120 h时，对照组和注水处理组的肌原纤维蛋白二级结构含量变化具有相似性，两个处理组的 α -螺旋的含量分别由36 h时的49.98%、46.41%显著降低至120 h时的44.56% ($p<0.01$)、43.23% ($p<0.01$)， β -折叠的含量分别由36 h时的30.31%、29.36%增加至120 h的35.83%($p<0.01$)、34.24%($p<0.01$)。150mM CaCl_2 处理组的结果显示， α -螺旋的含量急剧下降($p<0.001$)，无规则卷曲含量显著增加($p<0.05$)，成熟120 h时，大量的 α -螺旋转变为无规则卷曲，此时无规则卷曲的含量增加至44.29%。300 mM CaCl_2 处理组的肌原纤维蛋白二级结构的含量与150 mM CaCl_2 处理组的肌原纤维蛋白二级结构含量变化具有相似性。整个成熟过程中，注水处理组和对照组的肌原纤维蛋白二级结构分析显示，大量的 α -螺旋转变为 β -折叠；150 mM CaCl_2 处理组和300 mM CaCl_2 处理组的结果显示， α -螺旋转变为无规则卷曲。

拉曼光谱是分析肌原纤维蛋白二级结构含量变化的有效技术，酰胺 I 带是分析肌原纤维蛋白二级结构含量变化的主要特征带之一。Sun等^[25]利用拉曼光谱技术分析了广式香肠加工过程中，肌原纤维蛋白的二级结构含量变化，作者指出，广式香肠加工过程中肌原纤维蛋白的 α -螺旋逐渐转变为 β -折叠。Herrero等^[26]对冷藏或冷冻条件下鳕鱼的肌肉蛋白二级结构研究也发现， α -螺旋逐渐逐渐降低且减少的 α -螺旋转变为 β -折叠。我们对成熟过程中的鹅肉肌原纤维蛋白二级结构分析也发现，对照组和注水处理组的 α -螺旋的含量逐渐下降， β -折叠的含量逐渐上升；但我们的研究还发现，鹅肉宰后，注射150 mM CaCl_2 和300 mM CaCl_2 后 α -螺旋逐渐转变为无规则卷曲。这个结果可能是由于鹅肉宰后注射 CaCl_2 使得肌原纤维蛋白表面的离子作用增强，加速了蛋白表面的氢键的形成。Barrett等研究无机盐离子对蛋白的二级结构的影响时指出，无机盐离子加速了蛋白表面氢键的形成，使得二级结构的 α -螺旋的含量减少。Wu和Bertram等^[27]研究猪肉肌原纤维蛋白二级结构变化时指出，猪肉经高盐腌制后，蛋白中 α -螺旋含量显著下降。Beattie等^[28]应用拉曼光谱技术评价牛肉品质时指出， α -螺旋的含量与 β -折叠的含量的比率是影响牛肉嫩度的重要因素。Beattie, Bell等^[29]指出，与嫩度较好的肌肉相比，嫩度较差的肌肉二级结构中含有大量的 β -折叠。

表 1 成熟过程中肌原纤维蛋白的二级结构含量变化

Table 1 Changes in the secondary structural content of myofibril proteins during the ageing process

Secondary Structural Contents	group	Storage time			
		12 h	36 h	72 h	120 h
α -helical	control	50.69±0.23 ^a	49.98±0.17 ^a	47.17±0.21 ^b	44.56±0.37 ^c
	H ₂ O	52.51±25 ^a	46.41±0.28 ^b	45.06±0.35 ^c	43.23±0.16 ^d
	150 mM CaCl ₂	54.27±0.58 ^a	43.85±0.65 ^c	48.58±0.29 ^b	30.42±0.35 ^d
	300 mM CaCl ₂	56.65±0.37 ^a	47.19±0.31 ^b	40.05±0.43 ^c	32.03±0.22 ^d
β -sheet	control	30.31±0.13 ^c	28.27±0.18 ^d	31.07±0.11 ^b	35.83±0.21 ^a
	H ₂ O	29.36±0.27 ^c	29.19±0.31 ^c	31.89±0.22 ^b	34.24±0.28 ^a
	150 mM CaCl ₂	27.88±0.18 ^a	25.42±0.19 ^b	20.17±0.29 ^c	17.71±0.34 ^d
	300 mM CaCl ₂	26.15±37 ^a	15.14±0.16 ^d	20.36±0.19 ^b	18.05±0.27 ^c
β -turn	control	8.93±0.09 ^b	9.24±0.15 ^a	8.22±0.12 ^c	7.41±0.17 ^d
	H ₂ O	7.22±0.16 ^d	13.21±0.21 ^a	9.8±0.13 ^c	10.01±0.15 ^b
	150mM CaCl ₂	8.55±0.15 ^a	7.88±0.12 ^b	7.19±0.06 ^c	7.58±0.08 ^b
	300 mM CaCl ₂	8.70±0.09 ^c	10.03±0.08 ^a	9.73±0.07 ^b	7.12±0.13 ^d
random coil	control	10.07±0.15 ^c	12.51±0.13 ^b	13.54±0.19 ^a	12.20±0.18 ^b
	H ₂ O	10.91±0.12 ^c	11.19±0.25 ^c	13.25±0.29 ^a	12.52±0.17 ^b
	150 mM CaCl ₂	9.30±0.08 ^d	22.85±0.13 ^c	24.06±0.15 ^b	44.29±0.28 ^a
	300 mM CaCl ₂	8.50±0.07 ^d	18.64±0.09 ^c	29.86±0.11 ^b	41.80±0.35 ^a

注释: ^{a-d} different letters in the same row indicate that there is significant difference in the storage processing ($p < 0.05$).

3 结论

我们的研究证明, 鹅肉宰后注射 150 mM CaCl₂, 与注水处理组和对照组相比, 能有效降低鹅肉的剪切力值, 改善鹅肉嫩度; 但 150 mM CaCl₂ 处理组的蒸煮损失率大于对照组。鹅肉成熟过程中, 注射 150 mM CaCl₂ 后激活了 calpain 和 caspase3, 使得 calpain 和 caspase3 具有更强的酶活力, 促进了 calpain 和 caspase3 对肌原纤维蛋白的降解; caspase3 的活性在成熟 12 h~72 h 内显著降低, 而 calpain 的活性则在 12 h~120 h 内都显著性下降。拉曼光谱分析肌原纤维蛋白二级结构显示, 150 mM CaCl₂ 处理组 α -螺旋含量逐渐下降, 无规则卷曲含量逐渐增大; 注水处理组和对照组显示, α -螺旋转变为 β -折叠。Ca²⁺ 的注射浓度由 150 mM 增加至 300 mM 时, 鹅肉的剪切力值并未显著下降, calpain 和 caspase3 的活性也未明显增强, 不能有效改善鹅肉的嫩度。

参考文献

- [1] Marino R, Albenzio M, Della Malva A, et al. Proteolytic pattern of myofibrillar protein and meat tenderness as affected by breed and aging time [J]. Meat Science, 2013, 95(2): 281-287
- [2] Obuz E, Akkaya L, Gök V, et al. Effects of blade

tenderization, aging method and aging time on meat quality characteristics of *Longissimus lumbrorum* steaks from cull Holstein cows [J]. Meat Science, 2014, 96(3): 1227-1232

- [3] Bunmee T, Jaturasitha S, Kreuzer M, et al. Can calcium chloride injection facilitate the ageing-derived improvement in the quality of meat from culled dairy cows? [J] Meat Science, 2014, 96(4): 1440-1445
- [4] Rees M P, Trout G R, Warner R D. Effect of calcium infusion on tenderness and ageing rate of pork m. *Longissimus thoracis et lumbrorum* after accelerated boning [J]. Meat Science, 2002, 61(2): 169-179
- [5] Kemp C, Bardsley R, Parr T. Changes in caspase activity during the postmortem conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle [J]. Journal of Animal Science, 2006, 84(10): 2841-2846
- [6] Chowdhury I, Tharakan B, Bhat G K. Caspases-an update. comparative biochemistry and physiology part B [J]. Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 151(1): 10-27
- [7] Kemp C, Parr T. The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar proteins in porcine skeletal muscle [J]. Animal An International Journal of Animal Bioscience, 2008, 2(8): 1254-64
- [8] Toldrá F, Flores M. The use of muscle enzymes as predictors of pork meat quality [J]. Food Chemistry, 2000, 69(4):

- 387-395
- [9] Cao J-X, Ou C-R, Zou Y-F, et al. Activation of caspase-3 and its correlation with shear force in bovine skeletal muscles during postmortem conditioning [J]. *Journal of Animal Science*, 2013, 91(9): 4547-4552
- [10] Soh BY, Song H-O, Lee Y, et al. Identification of active *Plasmodium falciparum* calpain to establish screening system for Pf-calpain-based drug development [J]. *Malaria Journal*, 2013, 12(1): 1-12
- [11] Cao M-J, Jiang X-J, Zhong H-C, et al. Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of crucian carp (*Carasius auratus*) [J]. *Food Chemistry*, 2006, 94(1): 7-13
- [12] Schönfeldt H, Strydom PE. Effect of age and cut on cooking loss, juiciness and flavour of South African beef [J]. *Meat Science*, 2011, 87(3): 180-190
- [13] Huang M, Huang F, Xue M, et al. The effect of active caspase-3 on degradation of chicken myofibrillar proteins and structure of myofibrils [J]. *Food Chemistry*, 2011, 128(1): 22-27
- [14] Chen L, Feng X C, Lu F, et al. Effects of camptothecin, etoposide and Ca^{2+} on caspase-3 activity and myofibrillar disruption of chicken during postmortem ageing [J]. *Meat Science*, 2011, 87(3): 165-174
- [15] Twiner M J, Chidiac P, Dixon S J, et al. Extracellular organic compounds from the ichthyotoxic red tide alga *Heterosigma akashiwo* elevate cytosolic calcium and induce apoptosis in Sf9 cells [J]. *Harmful Algae*, 2005, 4(4): 789-800
- [16] Hopkins D, Thompson J. Factors contributing to proteolysis and disruption of myofibrillar proteins and the impact on tenderisation in beef and sheep meat [J]. *Crop and Pasture Science*, 2002, 53(2): 149-166
- [17] Koochmaraie M, Geesink G. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system [J]. *Meat Science*, 2006, 74(1): 34-43
- [18] Pomponio L, Lametsch R, Karlsson A H, et al. Evidence for post-mortem m-calpain autolysis in porcine muscle [J]. *Meat Science*, 2008, 80(3): 761-764
- [19] Pomponio L, Ertbjerg P. The effect of temperature on the activity of μ - and m-calpain and calpastatin during post-mortem storage of porcine longissimus muscle [J]. *Meat Science*, 2012, 91(1): 50-55
- [20] Wang D, Zhang M, Bian H, et al. Proteolysis and cathepsin activities in the processing of dry-cured duck [J]. *Poultry Science*, 2014, 93(3): 687-694
- [21] Lonergan E H, Zhang W, Lonergan S M. Biochemistry of postmortem muscle-Lessons on mechanisms of meat tenderization [J]. *Meat Science*, 2010, 86(1): 184-195
- [22] Suliman G, Hussein E, Al-Owaimer A. Improving mature camel-meat quality characteristics with calcium chloride injection [J]. *Journal of Camel Practice and Research*, 2013, 20(1): 53-57
- [23] Klinhom P, Klinhom J, Senapa J, et al. Improving the quality of citric acid and calcium chloride marinated culled cow meat [J]. *International Food Research Journal*, 2015, 22(4)
- [24] Kong B, Diao X, Xiong Y L. Postmortem calcium chloride injection alters ultrastructure and improves tenderness of mature Chinese yellow cattle longissimus muscle [J]. *Journal of Food Science*, 2006, 71(3): C124-C129
- [25] Sun W, Zhao Q, Zhao M, et al. Structural evaluation of myofibrillar proteins during processing of Cantonese sausage by Raman spectroscopy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(20): 11070-11077
- [26] Herrero A M, Carmona P, Careche M. Raman spectroscopic study of structural changes in hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle proteins during frozen storage [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(8): 2147-2153
- [27] Wu Z, Bertram H C, Kohler A, et al. Influence of aging and salting on protein secondary structures and water distribution in uncooked and cooked pork. A combined FT-IR microspectroscopy and 1H NMR relaxometry study [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(22): 8589-8597
- [28] Beattie J R, Bell S E, Borggaard C, et al. Preliminary investigations on the effects of ageing and cooking on the Raman spectra of porcine longissimus dorsi [J]. *Meat Science*, 2008, 80(4): 1205-1211
- [29] Beattie R J, Bell S J, Farmer L J, et al. Patterson D. Preliminary investigation of the application of Raman spectroscopy to the prediction of the sensory quality of beef silverside [J]. *Meat Science*, 2004, 66(4): 903-913