

# 快速冷却对宰后牦牛肉成熟过程中 细胞凋亡酶活力与嫩度的影响

李文东<sup>1</sup>, 韩玲<sup>1</sup>, 宋仁德<sup>2</sup>, 赵索南<sup>3</sup>, 石红梅<sup>4</sup>, 余群力<sup>1</sup>

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070) (2. 青海省玉树藏族自治州畜牧兽医工作站, 青海玉树 815000) (3. 青海省海北藏族自治州畜牧兽医科学研究所, 青海海北 812200) (4. 甘肃省甘南藏族自治州畜牧兽医科学研究所, 甘肃甘南 747000)

**摘要:** 为探究快速冷却对宰后牦牛肉成熟过程中嫩度与细胞凋亡酶活力的关系, 以常规冷却和快速冷却处理的牦牛背最长肌为研究对象, 分别在宰后不同时间点测定剪切力、肌原纤维小片化指数 (myofibrillar fragmentation index, MFI)、caspase-9、3 活力等指标变化。结果表明, 快速冷却处理使宰后初期肌肉中心温度下降速率加快, pH 下降速率降低。在宰后 6 h 内, MFI、caspase-9 活力变化不显著 ( $p>0.05$ )。pH、剪切力、caspase-9、3 活力出现峰值时间延迟。此外, 与常规冷却相比, 快速冷却组剪切力值普遍较高, MFI 较低。宰后 168 h, 快速冷却组与常规冷却组 MFI 分别升高了 56.59%、58.60%, 差异显著 ( $p<0.05$ )。以上研究表明, 快速冷却方式下温度下降速率的提高显著减缓了 pH 的下降, 使 caspase 活力在成熟前期被抑制, 导致其对肌原纤维蛋白的降解减弱, 从而降低牛肉嫩度并延长肌肉成熟时间。

**关键词:** 快速冷却; 常规冷却; 细胞凋亡; 嫩度

文章编号: 1673-9078(2019)03-73-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.012

## The Effect of Rapid Chilling on Tenderness and Apoptotic Activity during Yak Meat Postmortem Aging

LI Wen-dong<sup>1</sup>, HAN LING<sup>1</sup>, SONG Ren-de<sup>2</sup>, ZHAO Suo-nan<sup>3</sup>, SHI Hong-mei<sup>4</sup>, YU Qun-li<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

(2. Institute of Animal Science and Veterinary Science of Yushu Tibetan Autonomous Prefecture, Yushu 815000, China)

(3. Institute of Animal Science and Veterinary Science of Haibei Tibetan Autonomous Prefecture, Haibei 812200, China)

(4. Institute of Animal Science and Veterinary Science of Gannan Tibetan Autonomous Prefecture, Gannan 747000, China)

**Abstract:** In order to explore the relationship between the tenderness and the apoptotic activity during yak meat postmortem aging. The longissimus dorsi muscles of the yak treated by conventional chilling and rapid chilling were taken as experiment objects. The changes of shear force, myofibrillar fragmentation index (MFI) and caspase-9,3 activity at different time points in postmortem were measured. The results indicated that rapid chilling accelerated the rate of decrease of temperature in the muscle center and decreased the rate of drop of pH value in early postmortem aging. The rapid chilling led to no significant change in activity of caspase-9 and MFI within 6 h in postmortem ( $p>0.05$ ), which delayed the peak times of pH value, shear force and caspase-9,3 activities. In addition, the shear force value in rapid chilling group was higher than the value in conventional chilling group, and the MFI was lower in rapid chilling group compared to conventional chilling group. The MFI in rapid chilling group and conventional chilling group increased by 56.59% and 58.60%, respectively, at 168 h in postmortem aging, the difference was significant ( $p<0.05$ ). The above research shows that the increase of temperature reduction rate during rapid chilling significantly slows down the reduction rate of pH, so that the apoptotic activity was inhibited in the early postmortem aging, leading to the weak degradation of myofibrillar protein, which reduced the tenderness of beef and prolonged the aging time of muscle.

**Key words:** rapid chilling; conventional chilling; apoptotic activity; tenderness

收稿日期: 2018-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31560463); 甘肃省财政厅专项和国家肉牛牦牛产业技术体系项目 (CARS-37)

作者简介: 李文东 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工

通讯作者: 韩玲 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工及贮藏

嫩度是决定畜禽肉食用品质的最重要指标<sup>[1]</sup>。影响肉嫩度的因素除了畜禽品种、基因型、性别和年龄等宰前生理因素外,还包括宰后肉的成熟时间和温度、胴体吊挂方式、电刺激等物理化学因素<sup>[2]</sup>。运用宰后成熟技术以改善牛肉嫩度的方法是针对破坏肌肉的组织结构,所以宰后成熟过程中肌肉结构的变化及细胞骨架蛋白的降解是导致肉嫩度产生差异的主要原因<sup>[3]</sup>。目前诸多学者研究指出,宰后肌肉嫩度的变化是在多种内源性蛋白酶的协同作用下对骨骼肌细胞和肌原纤维蛋白的水解而完成的,其中一种重要的酶类就是细胞凋亡酶<sup>[4]</sup>。细胞凋亡酶对肌肉的嫩化作用是当前肉品科学领域研究的热点,线粒体介导的细胞凋亡途径是参与宰后肌肉嫩化的主要途径,宰后肌肉成熟过程中线粒体细胞凋亡通路被激活,caspase 家族中最重要的成员 caspase-3 在宰后初期被激活,引起肌原纤维蛋白的降解而提高了肉的嫩度<sup>[5-7]</sup>。

温度是影响肌肉成熟进程和食用品质的关键控制点<sup>[8]</sup>。宰后胴体在不同温度下的冷却方式对内源性蛋白酶的活性影响很大。Appaiahgari<sup>[9]</sup>、Cruzen 等<sup>[10]</sup>研究发现宰后成熟阶段较高温度和较低 pH 值能加快溶酶体的裂解,释放出半胱氨酸型组织蛋白酶 B,继而参与宰后肉的分解。Fernández 等<sup>[11]</sup>研究指出延迟冷却导致早期钙激活酶的失活率降低,提高了钙激活酶参与宰后肌肉嫩化的速度。李晶晶<sup>[12]</sup>通过蛋白免疫印迹法对牛肉进行研究结果显示,在三段式冷却和传统冷却方式下 caspase-3、9 酶原均被激活,但在宰后成熟过程中不同时间点无活性的 caspase-3、9 酶原被分解产生的活性片段的量有所不同。张瑞红<sup>[13]</sup>研究表明,三段式冷却法可以提高淘汰奶牛背最长肌 caspase-3 的活性,促进了 caspase-3 参与肌原纤维蛋白的降解。以上研究均说明宰后不同温度下的冷却方式确实对肉的嫩化产生了影响,而这种影响又是通过内源性蛋白酶所介导的。

目前有关快速冷却方式在肉品中的研究主要集中在延长产品的货架期,而关于快速冷却对肌肉宰后成熟过程中细胞凋亡酶系统有何影响的研究报道较少。因此本研究探究宰后快速冷却方式对细胞凋亡主要酶 caspase-3、9 活力的影响。从细胞凋亡酶活力角度探讨快速冷却对牦牛肉嫩度的影响,为优化并改善牦牛肉屠宰工业中现有的冷却工艺提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与试剂

试验材料:牦牛由青海省百德食品有限公司提供,

选取发育正常、健康无病、体重均匀 120±20 kg 的 4~6 岁牦牛 8 头,宰前 24 h 禁食禁水,按传统穆斯林方式屠宰。

试验试剂: caspase-9、3 活性检测试剂盒,武汉默沙克生物科技有限公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒,上海美季生物技术有限公司; KCl、MgCl<sub>2</sub>、EDTA、K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、NaN<sub>3</sub>、CuSO<sub>4</sub>、NaOH、HCl、KI、酒石酸钾钠等,以上试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

GT16-3 型高速台式离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司; XHF-DY 型高速分散器,宁波新芝生物科技股份有限公司; C-LM3B 型数显式肌肉嫩度仪,北京天翔飞域仪器设备有限公司; SPectramax M2 型酶标仪,美国美谷分子仪器有限公司; SG8-B 型便携式 pH 计,深圳市鑫航兴科技有限公司; DHG-9140 型电热恒温鼓风干燥箱,山东博科生物产业有限公司; 电子数显食品温度计,衡水盛杰仪器仪表有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品采集与处理

宰后 45 min 内迅速取出牦牛胴体左右两侧背最长肌作为试验对象,随后从每头牦牛背最长肌取约 30 g 肉样,用锡箔纸包裹好后立即放入液氮中,作为 0 h 的样品。其中左侧背最长肌作为对照组按照常规冷却 (conventional chilling, CC) 方式处理;右侧背最长肌为处理组按照快速冷却 (rapid chilling, RC) 方式处理。常规冷却组的肉样置于 4 °C 冷库中冷藏,快速冷却组的肉样首先置于 -20±2 °C 环境的冷库中,当其中心温度降至 4 °C 后转移至 4 °C 冷库中继续冷藏。在此过程中,分别在宰后成熟时间点 0、6、12、24、72、120、168 h 测定肌肉中心温度、pH、剪切力等指标。对于 MFI、caspase-9、3 活力等不便于立即测定的指标,将肉样在设计时间点采集并用液氮迅速冷冻后立即运回实验室置于 -80 °C 超低温冰箱冻藏待测。

#### 1.3.2 温度

采用插入式电子数显食品温度计测定胴体的中心温度,探头插入深度为 1~2 cm,连续测定 3 次,取平均值。

#### 1.3.3 pH 值测定

采用便携式 pH 计测定待测肉样的 pH 值,测定时使 pH 计的探头与肉样充分接触,待读数稳定后记录所测得的数据,每组肉样重复测定 3 次,取平均值。

#### 1.3.4 剪切力

将去除表面脂肪和结缔组织的肉样装入塑料蒸煮

袋,置于 80 °C 恒温水浴锅中加热,用数显式温度计测定加热过程中肉样的中心温度,当中心温度达到 75 °C 时,恒温保持 5 min 后冷却至室温,然后用 1.27 cm 的取样器沿肌纤维方向钻取测定样品,用 C-LM3B 型数显式肌肉嫩度仪测定剪切力值,每组肉样平行测定 3 次,取平均值。

### 1.3.5 MFI

参考 Guillemin 等<sup>[14]</sup>的方法并稍作修改。精确称取 4 g 肉样,加入 20 mL MFI 缓冲液(100 mmol/L KCl、20 mmol/L K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1 mmol/L NaN<sub>3</sub>, pH 7.1),然后在冰浴下匀浆。得到的匀浆液于 4 °C 条件下 1000 r/min 离心 15 min,弃去上清液。沉淀中加入 20 mL MFI 缓冲液溶解后重新匀浆,再离心弃去上清液。所得沉淀用 10 mL MFI 缓冲液溶解,用 200 目尼龙筛网过滤该悬浊液,另用 5 mL MFI 缓冲液帮助肌原纤维蛋白通过滤网。过滤所得的肌原纤维蛋白悬浊液用双缩脲法测定其蛋白含量,然后用 MFI 缓冲液将其浓度调整至 0.5 mg/mL,在 540 nm 下测定其吸光值,将所得数值乘以 200,即为 MFI。

### 1.3.6 caspase 活力

#### 1.3.6.1 caspase-9 活力

按照 caspase-9 活性检测试剂盒说明书并稍作修改对 caspase-9 的活性进行测定。取 90 mg 组织肉样,剪碎后加入 500 μL caspase-9 裂解液,用玻璃匀浆器于冰浴下匀浆 30 次。匀浆液于 4 °C, 10000 r/min 离心 10 min,离心完毕后取上清液待测。取 85 μL caspase-9 反应缓冲液,10 μL 待测上清液,5 μL 2 mM caspase-9 反应底物 IETD-pNA,依次加入 96 孔酶标板中,对照孔加入 95 μL caspase-9 反应缓冲液,5 μL caspase-9 反应底物 IETD-pNA,用封口膜封住,置于 37 °C 恒温箱中反应 2 h,取下封口膜,用酶标仪在 405 nm 处测定吸光度值。

#### 1.3.6.2 caspase-3 活力

按照 caspase-3 活性检测试剂盒说明书并稍作修改对 caspase-3 的活性进行测定。肉样处理及操作同 1.3.6.1 中 caspase-9 活性测定方法,用酶标仪在 405 nm 处测定吸光度值。

### 1.3.7 数据处理与统计分析

用 IBM SPSS Statistics 22.0 分析软件对数据进行方差分析,试验结果均采用“平均数±标准差”表示,数据平行测定 3 次,采用单因素方差分析(ANOVA)和多重比较(Duncan 法)进行数据间的差异显著性分析,用 Origin 8.5 软件进行图形绘制。

## 2 结果与讨论

## 2.1 结果

### 2.1.1 冷却方式对肌肉中心温度的影响

畜禽胴体僵直前期冷却方式影响肌肉的僵直性质,肌肉僵直的收缩程度与温度有很大的关系<sup>[15]</sup>。由图 1 可知,常规冷却组在宰后 0~12 h,肌肉中心温度由 36.41 °C 显著( $p<0.05$ )降低至 5.14 °C;12 h 之后肌肉中心温度仍呈下降趋势,并于宰后 168 h 降至 4.30 °C,但各时间点温度总体保持在 4 °C 左右,差异不显著( $p>0.05$ )。快速冷却组在宰后 6 h 温度显著( $p<0.05$ )下降至 5.37 °C;12~168 h,肌肉中心温度由 4.95 °C 缓慢降至 4.05 °C,各时间点温度差异不显著( $p>0.05$ )。在整个成熟进程中,宰后 6 h,常规冷却组肌肉中心温度(10.17 °C)极显著( $p<0.01$ )高于快速冷却组(5.37 °C),6 h 之后,常规冷却组虽略高于快速冷却组,但两组温度均维持在 4 °C 左右,无明显差异( $p>0.05$ )。

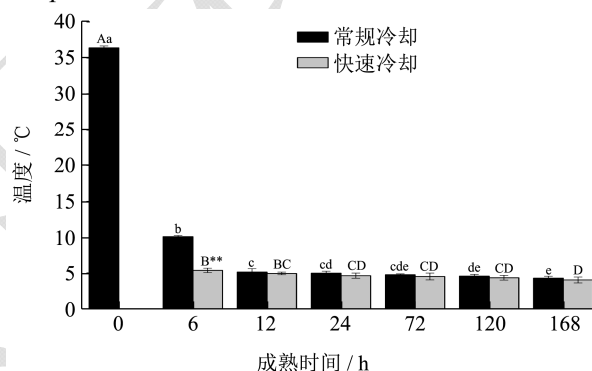


图 1 冷却方式对肌肉中心温度的影响

Fig.1 Effect of chilling methods on center temperature of muscle

注:图中大、小写字母分别表示快速冷却和常规冷却组在成熟过程中指标变化差异显著( $p<0.05$ );快速冷却组和常规冷却组在同一成熟时间点指标变化差异显著用“\*”表示( $p<0.05$ ),差异极显著用“\*\*”表示( $p<0.01$ ),下同。

### 2.1.2 冷却方式对肌肉 pH 值的影响

由图 2 可知,宰后成熟过程中常规与快速两种冷却方式处理的肌肉 pH 值均下降,在达到极限 pH 后又缓慢上升。常规冷却组 pH 于宰后 72 h 内显著( $p<0.05$ )降低,并于宰后 72 h 达到极限 pH 5.56;120 h~168 h,肌肉 pH 由 5.65 升至 5.66,但无明显差异( $p>0.05$ )。快速冷却组在宰后 120 h 内 pH 显著( $p<0.05$ )下降,于 120 h 达到极限 pH 5.57;成熟至 168 h,肌肉 pH 为 5.61,较 120 h 稍有上升但差异不显著( $p>0.05$ )。在整个成熟阶段,宰后 6 h 与 72 h,快速冷却组肌肉 pH (6.28、5.66)极显著( $p<0.01$ )高于常规冷却组(6.07、5.56);宰后 120 h,常规冷却组 pH(5.65)显著( $p<0.05$ )

高于快速冷却组 (5.57)。同时, 两组极限 pH 差异也不显著 ( $p>0.05$ )。

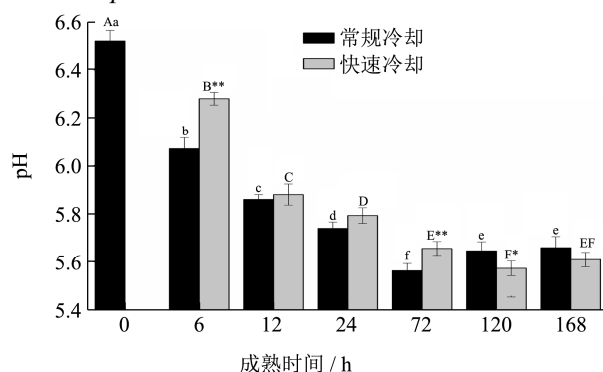


图2 冷却方式对肌肉 pH 值的影响

Fig.2 Effect of chilling methods on pH value of muscle

### 2.1.3 冷却方式对肌肉剪切力的影响

剪切力是评价肉嫩度最重要的指标之一, 剪切力值越低表明肌肉嫩度越好<sup>[16]</sup>。由图 3 可以看出, 随着宰后成熟时间的延长, 常规与快速两种冷却方式处理的肌肉剪切力值均由 4.51 kgf 开始逐渐上升, 分别在宰后 72 h、120 h 达到最大值 8.64 kgf、9.65 kgf, 随后显著下降 ( $p<0.05$ ), 于宰后 168 h, 两组剪切力值分别降至 5.22 kgf、7.13 kgf。在整个成熟阶段, 快速冷却组剪切力值均高于常规冷却组, 其中宰后 6 h、120 h、168 h 快速冷却组剪切力值极显著 ( $p<0.01$ ) 高于常规冷却组; 24、72 h 快速冷却组显著 ( $p<0.05$ ) 高于常规冷却组。

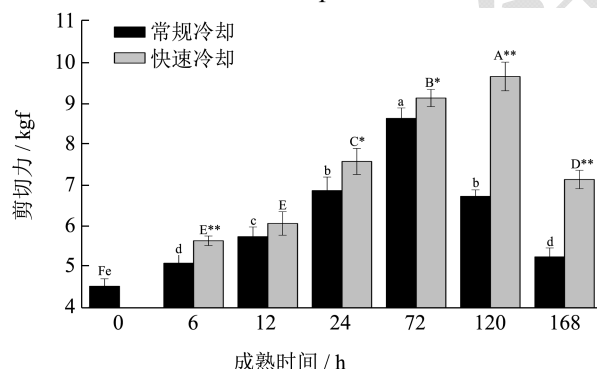


图3 冷却方式对肌肉剪切力的影响

Fig.3 Effect of chilling methods on shear stress of muscle

### 2.1.4 冷却方式对肌肉 MFI 的影响

MFI 是反应肌肉内部肌原纤维蛋白完整性的重要指标, 同时也标志着肉成熟过程中嫩度的变化<sup>[17]</sup>。由图 4 可知, 常规与快速两种冷却方式下肌肉 MFI 在 0~168 h 分别增加了 58.60%、56.59%, 差异显著 ( $p<0.05$ )。常规冷却组在成熟过程中的各时间点 MFI 差异显著 ( $p<0.05$ ); 快速冷却组 MFI 在宰后 0~6 h 内虽然由 30.97 上升至 32.58, 但差异不显著 ( $p>0.05$ ), 6 h 后随着成熟时间的增加, MFI 显著 ( $p<0.05$ ) 上升达到最大值。整个成熟进程中, 快速冷却组 MFI 总体

水平低于常规冷却组, 其中宰后 6 h、24 h、72 h、120 h、168 h 快速冷却组 MFI 显著 ( $p<0.05$ ) 或极显著 ( $p<0.01$ ) 低于常规冷却组, 这一结果与剪切力测定结果基本一致, 呈负相关关系。

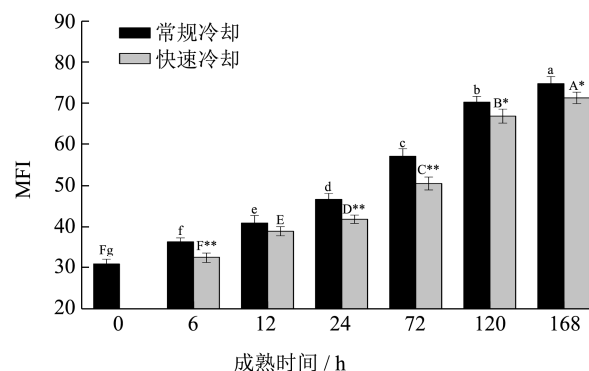


图4 冷却方式对肌肉 MFI 的影响

Fig.4 Effect of chilling methods on MFI of muscle

### 2.1.5 冷却方式对肌肉 caspase-9 活力的影响

图 5 表示不同冷却方式对肌肉中 caspase-9 活力的影响。由图可知, 宰后成熟过程中 caspase-9 的活力先增大后降低。常规冷却组在宰后 0~6 h 内 caspase-9 的活力由 14.17 nmol/(mg·h) 显著 ( $p<0.05$ ) 升高, 在 6 h 达到最大值 18.36 nmol/(mg·h) 后显著 ( $p<0.05$ ) 下降, 于宰后 168 h 降至 9.76 nmol/(mg·h)。快速冷却组 caspase-9 活力在宰后 6 h 内无明显升高 ( $p>0.05$ ); 6~12 h 活力由 14.83 nmol/(mg·h) 升高至最大值 17.68 nmol/(mg·h), 差异显著 ( $p<0.05$ ); 12 h 之后活力显著降低 ( $p<0.05$ ), 于宰后 168 h 降至 10.05 nmol/(mg·h)。在整个成熟进程中, 宰后 6 h, 常规冷却组 caspase-9 活力极显著 ( $p<0.01$ ) 高于快速冷却组; 宰后 12 h、24 h、72 h, 快速冷却组 caspase-9 活力显著 ( $p<0.05$ ) 或极显著 ( $p<0.01$ ) 高于常规冷却组; 72 h 之后, 快速冷却组 caspase-9 活力仍高于常规冷却组且两处理方式下 caspase-9 活力继续下降至最低值但各时间点 caspase-9 无显著差异 ( $p>0.05$ )。同时, 两种冷却方式下 caspase-9 最大活力间无明显差异 ( $p>0.05$ )。

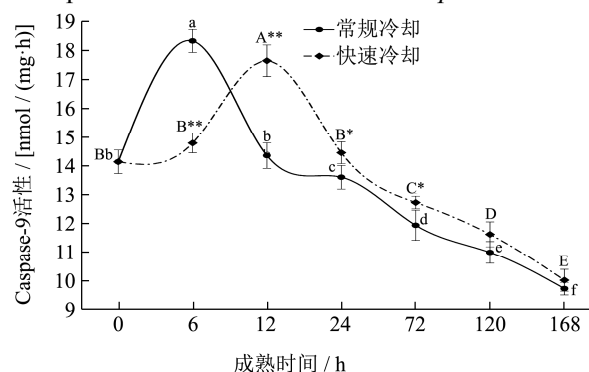


图5 冷却方式对肌肉 caspase-9 活力的影响

Fig.5 Effect of chilling methods on caspase-9 activity of muscle

### 2.1.6 冷却方式对肌肉 caspase-3 活力的影响

宰后成熟过程中 caspase-3 活力先增加后降低最后趋于稳定(图6)。常规冷却组 caspase-3 活力在宰后 12 h 内由 8.24 nmol/(mg·h)显著( $p<0.05$ )增加,于 12 h 达到最大活力 23.75 nmol/(mg·h); 12 h 之后, caspase-3 活力显著( $p<0.05$ )降低至 10.94 nmol/(mg·h)后虽有上升趋势,但成熟至 168 h, caspase-3 活力又降至 10.71 nmol/(mg·h),与宰后 72 h 的酶活力间无显著差异( $p>0.05$ )。快速冷却组 caspase-3 活力在 0~6 h 升高缓慢,6 h 后,活力显著( $p<0.05$ )升高,并于宰后 24 h 达到最大活力 22.08 nmol/(mg·h); 之后在成熟至 120 h 显著( $p<0.05$ )降低到 10.81 nmol/(mg·h); 120 h~168 h, caspase-3 活力虽缓慢上升,但总体趋于稳定。在整个成熟过程中,宰后 6 h、12 h,常规冷却组 caspase-3 的活力极显著( $p<0.01$ )高于快速冷却组,而在宰后 24~72 h,快速冷却组 caspase-3 活力极显著( $p<0.01$ )高于常规冷却组; 72 h 之后,常规与快速冷却组差异逐渐减小,于宰后 168 h, caspase-3 活力分别为 10.71 nmol/(mg·h)、11.21 nmol/(mg·h),差异不显著( $p>0.05$ )。

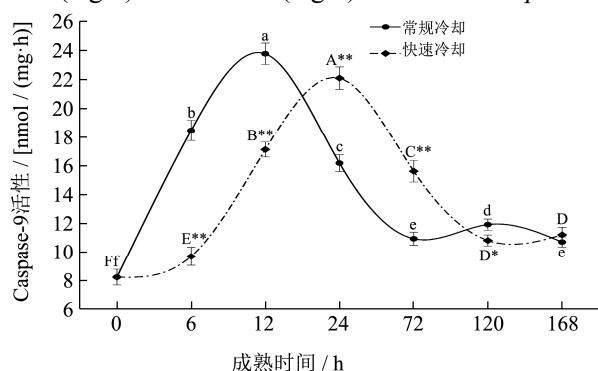


图6 冷却方式对肌肉 caspase-3 活力的影响

Fig.6 Effect of chilling method on caspase-3 activity of muscle

## 2.2 讨论

畜禽被屠宰放血后,由于呼吸作用停止,使机体处于无氧状态,肌肉组织细胞的新陈代谢环境被破坏,体内肌糖原开始进行无氧糖酵解而被不断分解产生乳酸,导致宰后肌肉 pH 下降。宰后肌肉进入尸僵阶段前,温度和 pH 之间的关系是影响肉嫩度的关键因素<sup>[18]</sup>,同时宰后初期细胞内环境的酸化也有利于肉质的嫩化,且较低的 pH 有利于 caspase 的活化<sup>[19]</sup>。Bendall<sup>[20]</sup>研究表明,牛肉宰后僵直阶段 pH 在降低到 6.2 以下之前,中心温度低于 10 °C 极易产生冷收缩导致牛肉嫩度显著增大。我们的试验表明,常规冷却组在宰后 6 h 肉样中心温度降至 10.17 °C, pH 降至 6.07,而快速冷却组在宰后 6 h 肌肉 pH 未降至 6.2 时温度已降至 10 °C 以下,这与 Bendall 的研究结果一致,说明在低温和

高 pH 环境条件下,肌肉中肌浆网内的  $\text{Ca}^{2+}$  未能及时释放并不断积累使得肌动球蛋白 ATP 酶被激活,从而产生肌肉痉挛,肌纤维迅速收缩,导致牛肉嫩度变差。pH 作为判断肌肉成熟进程的重要指标,当达到极限 pH 时,胴体进入宰后僵直最大化阶段<sup>[21]</sup>。宰后 0~6 h 内,肌肉 pH 下降速率快速冷却组(3.68%)显著低于常规冷却组(6.90%),这可能是由于快速冷却方式下,低温减缓了糖原的酵解速度,使肌肉进入僵直期需要的时间延长。常规冷却组由于温度下降速率的减缓显著加快了肌肉 pH 的下降,使极限 pH 常规冷却组(5.56)低于快速冷却组(5.57),常规与快速冷却组分别在宰后 72 h、120 h 达到极限 pH,但两种冷却方式下极限 pH 之间无显著差异。这说明快速冷却未引起极限 pH 的变化,但它减缓了糖酵解速率,对宰后肌肉成熟进程有延迟作用。

宰后肌肉成熟过程中,细胞凋亡酶降解肌原纤维蛋白能够改善肉的嫩度,而 MFI 能够反应肌原纤维结构被破坏及肌原纤维蛋白被降解的程度<sup>[22]</sup>。细胞凋亡酶的活力与 MFI 呈正相关<sup>[23]</sup>。Taylor 等<sup>[24]</sup>研究发现 MFI 反应了肌节 I 带附近关键细胞骨架的降解程度。MFI 越大,表明肌原纤维内部结构完整性破坏程度就越大。在不同温度条件下, caspase 活力存在很大差异。张静<sup>[25]</sup>研究不同环境温度对运动大鼠骨骼肌细胞凋亡的影响,结果表明高温会显著提高肌细胞凋亡率及 caspase-3 活力。本试验在常规与快速两种冷却方式处理下的牦牛背最长肌中 caspase 活力在整个成熟过程中均存在明显变化。常规冷却组在宰后初期由于 pH 下降速率较快,在低 pH 环境下 caspase 易被激活,先于快速冷却组对肌原纤维蛋白进行水解,而快速冷却组 caspase 活力在 6 h 后才开始显著升高,明显慢于常规冷却组,这与 MFI 在 0~6 h 内由 30.97 缓慢上升至 32.58 变化相对应,说明快速冷却能够延长 caspase 的存活时间,使得肉的成熟时间推迟。常规冷却组 caspase-9、3 分别在宰后 6 h、12 h 达到最大活力 18.36 nmol/(mg·h)、23.75 nmol/(mg·h),快速冷却组 caspase-9、3 分别于宰后 12 h、24 h 活力达到最大值 17.68 nmol/(mg·h)、22.08 nmol/(mg·h),但两种冷却方式下 caspase-9、3 最大活力之间无显著差异。同时,常规冷却组 caspase-9、3 在宰后被激活并达到最大值之前其活力显著高于快速冷却组,之后随着宰后成熟的继续进行,常规冷却组 caspase-9、3 活力逐渐降低,而快速冷却组 caspase-9、3 活力仍处于上升状态。这表明宰后参与肌原纤维蛋白水解的细胞凋亡酶系统中 caspase-9 先被激活,然后 caspase-3 再被激活,这与 Cao 等<sup>[26]</sup>对牛背最长肌、半腱肌及腰小肌中 caspase-3

和 caspase-9 活性的测定中发现 caspase-9 在宰后 4 h 活性最大, 而 caspase-3 活性在宰后 24 h 达到最大这个结果相似。此外本研究结果也表明常规冷却与快速冷却方式处理的肉样在整个成熟过程中的大部分时间内, caspase-9、3 的活力在成熟同一时间点差异显著。同时, 在整个成熟进程中快速冷却组的剪切力值高于常规冷却组, 这是由于快速冷却方式处理下前期的低温抑制了 caspase 的活力, 使 caspase 对肌原纤维蛋白和骨架蛋白的降解减弱, 从而使剪切力值增大, 肉的嫩度变差, 这与 Wang 等<sup>[27]</sup>人研究结果一致, 说明温度确实对肌肉中 caspase 等内源酶活性有很大的影响, 也证明了较低 pH 环境下更有利于肉的嫩化及 caspase 的激活。纵观整个宰后成熟进程中 caspase-9、3 活力与剪切力值及 MFI 的变化趋势, 可以看出, 两种冷却方式下肉嫩度均得到了不同程度的改变, 但快速冷却处理由于低温及高 pH 环境不利于 caspase 的激活并抑制了宰后初期 caspase 的活性, 使其对肌肉的嫩化晚于常规冷却处理组, 使牦牛肉宰后成熟时间延长。

### 3 结论

快速冷却处理前期温度下降速率的提高显著减缓了 pH 的下降, 使 caspase-9、3 在低温高 pH 环境下不易被激活, 同时低温下 caspase-9、3 的活力受到抑制, 导致 caspase 对肌原纤维蛋白和骨架蛋白的降解减弱, 使肉的嫩化速率降低, 肌肉成熟时间延长。

### 参考文献

- [1] Sierra V, Fernández-Suárez V, Castro P, et al. Identification of biomarkers of meat tenderisation and its use for early classification of Asturian beef into fast and late tenderizing meat [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2012, 92(13): 2727-2740
- [2] 汤晓艳, 周光宏, 徐幸莲, 等. 肉嫩度决定因子及牛肉嫩化技术研究进展[J]. 中国农业科学, 2007, 40(12): 2835-2841  
TANG Xiao-yan, ZHOU Guang-hong, XU Xing-lian, et al. Advances of research on factors affecting meat tenderness and techniques for beef tenderization [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(12): 2835-2841
- [3] Xue M, Huang F, Huang M, et al. Influence of oxidation on myofibrillar proteins degradation from bovine via  $\mu$ -calpain [J]. Food Chemistry, 2012, 134(1): 106-112
- [4] Costelli P, Reffo P, Penna F, et al.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteolysis in muscle wasting [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37(10): 2134-2146
- [5] Kemp C M, Bardsley R G, 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] Huang F, Huang M, Zhou G, et al. *In vitro* proteolysis of myofibrillar proteins from beef skeletal muscle by caspase-3 and caspase-6 [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(17): 9658-9663
- [7] Wang L L, Han L, Ma X L, et al. Effect of mitochondrial apoptotic activation through the mitochondrial membrane permeability transition pore on yak meat tenderness during postmortem aging [J]. Food Chemistry, 2017, 234: 323
- [8] White A, O'Sullivan A, Troy D J, et al. Effects of electrical stimulation, chilling temperature and hot-boning on the tenderness of bovine muscles [J]. Meat Science, 2006, 73(2): 196-203
- [9] Appaiahgari M B, Vratil S. Clinical development of IMOJEV<sup>®</sup>-a recombinant Japanese encephalitis chimeric vaccine (JE-CV) [J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2012, 12(9): 1251-1263
- [10] Cruzen S M, Paulino P V, Lonergan S M, et al. Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle [J]. Meat Science, 2014, 96(2): 854-861
- [11] Fernández A M, Vieira C. Effect of chilling applied to suckling lamb carcasses on hygienic, physicochemical and sensory meat quality [J]. Meat Science, 2012, 92(4): 569-574
- [12] 李晶晶. 宰后不同冷却方式对牛背最长肌 Caspase-3, 9 活性以及嫩度的影响[D]. 黑龙江: 黑龙江八一农垦大学, 2016  
LI Jing-jing. Effect of different chilling methods on Caspase-3, 9 activity and tenderness of beef longissimus during postmortem [D]. Heilongjiang: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2016
- [13] 张瑞红. 畜禽 caspase-3 活性比较及冷却方法对其活性的影响[D]. 黑龙江: 黑龙江八一农垦大学, 2013  
ZHANG Rui-hong. Comparison of caspase-3 activity in livestock and poultry and different chilling method on caspase-3 activity [D]. Heilongjiang: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2013
- [14] Guillemain N, Bonnet M, Jurie C, et al. Functional analysis of beef tenderness [J]. Journal of Proteomics, 2011, 75(2): 352-365
- [15] Thompson J M, Hopkins D L, D'Souza D N, et al. The impact of processing on sensory and objective measurements of sheep meat eating quality [J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2005, 45(5): 561-573
- [16] 刘璐, 苏玉虹, 王军, 等. 猪肉嫩度相关 QTL 整合定位与基因

- 关联分析研究[J].中国农学通报,2012,28(20):37-42
- LIU Lu, SU Yu-hong, WANG Jun, et al. Meta-analysis of tenderness QTL in swine [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(20): 37-42
- [17] Volpelli L A, Failla S, Sepulcri A, et al. Calpain system in vitro activity and myofibril fragmentation index in fallow deer (*Damadama*): effects of age and supplementary feeding [J]. Meat Science, 2005, 69(3): 579-582
- [18] Hannula T, Puolanne E. The effect of cooling rate on beef tenderness: The significance of pH at 7 °C [J]. Meat Science, 2004, 67(3): 403-408
- [19] Segal M S, Beem E. Effect of pH, ionic charge, and osmolality on cytochrome c-mediated caspase-3 activity [J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2001, 281(4): 1196-1204
- [20] Bendall J R. Variability in rates of pH fall and of lactate production in the muscles on cooling beef carcasses [J]. Meat Science, 1978, 2(2): 91-104
- [21] 李鹏.不同极限 pH 值牛肉成熟过程中品质变化及变化机制研究[D].泰安:山东农业大学,2014
- LI Peng. Quality changes and underlying mechanisms of different ultimate pH beef during ageing [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014
- [22] Jia Chun Tian, Ling Han, Qun Li Yu, et al. Changes in tenderness and cathepsins activity during post mortem ageing of yak meat [J]. Canadian Journal of Animal Science, 2013, 93(3): 321-328
- [23] 孙志昶,冯晓琴,韩玲,等.牦牛肉宰后成熟嫩化与细胞凋亡酶活力变化研究[J].农业机械学报,2014,45(1):191-196
- SUN Zhi-chang, FENG Xiao-qin, HAN Ling, et al. Tenderness and apoptotic activity of yak meat during postmortem aging [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(1): 191-196
- [24] Taylor R G, Geesink G H, Thompson V F, et al. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization [J]. Journal of Animal Science, 1995, 73(5): 1351-1367
- [25] 张静.不同温度刺激下运动对大鼠骨骼肌细胞凋亡的影响[D].武汉:湖北大学,2013
- ZHANG Jing. The impact of different-temperature exercise on rats' skeletal muscle apoptosis [D]. Wuhan: Hubei University, 2013
- [26] 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
- [27] Wang D, Dong H, Zhang M, et al. Changes in actomyosin dissociation and endogenous enzyme activities during heating and their relationship with duck meat tenderness [J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 675-679

(上接第 224 页)

- [23] 李腾飞,赵风年,张超,等.高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定番茄中水杨酸和赤霉素[J].食品科学,2016,37(8): 182-186
- LI Teng-fei, ZHAO Feng-nian, ZHANG Chao, et al. Simultaneous determination of salicylic acid and gibberellic acid in tomato by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Science, 2016, 37(8): 182-186
- [24] Dávid S, Márat P, Gábor S, et al. Robust and sensitive LC/MS-MS method for simultaneous detection of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma [J]. Microchemical Journal, 2018, 136: 200-208
- [25] GB/T 27404-2008,实验室质量控制规范 食品理化检验[S]
- GB/T 27404-2008, Criterion on quality control of laboratories-chemical testing of food [S]
- [26] 王立琦,贺利民,曾振灵,等.液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J].质谱学报,2011,32(6):321-332
- WANG Li-qi, HE Li-min, ZENG Zhen-ling, et al. Progress in matrix effect of veterinary drug residues analysis by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2011, 32(6): 321-332
- [27] 朱晓玲,张莉,韩智,等.湖北省水产养殖环节安全现状及所存在的问题-基于对湖北咸宁、仙桃和潜江三地的实地调研[J].食品安全质量检测学报,2018,9(8):1906-1910
- ZHU Xiao-ling, ZHANG Li, HAN Zhi, et al. Present status and existing problems of aquaculture safety in Hubei province-Based on the field investigation of Xianning, Xiantao and Qianjiang in Hubei [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(8): 1906-1910