

蛋白质磷酸化和亚硝基化互作对宰后羊肉嫩度的影响

杜曼婷^{1,2,3}, 高梦丽¹, 游紫燕¹, 李可^{1,2,3}, 白艳红^{1,2,3,*}

(1. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南省冷链食品质量安全控制重点实验室, 河南 郑州 450001; 3. 食品生产与安全河南省协同创新中心, 河南 郑州 450001)

摘要: 以宰后羊背最长肌为研究对象, 利用磷酸酶抑制剂、激酶抑制剂、S-亚硝基谷胱甘肽和一氧化氮合成酶抑制剂分别调控肉糜样品的磷酸化和亚硝基化修饰程度, 通过分析孵育期间(4℃)样品的磷酸化水平、亚硝基化水平、pH值、肌原纤维小片化指数、肌间线蛋白和肌钙蛋白-T降解程度等指标的变化, 探究蛋白质磷酸化和亚硝基化互作对宰后羊肉嫩度的影响。结果表明: 在孵育前期(12 h)和后期(48~72 h), 磷酸化处理组样品的磷酸化水平显著高于磷酸化和亚硝基化共同处理组($P < 0.05$), 蛋白质亚硝基化会抑制磷酸化修饰反应。当磷酸化和亚硝基化修饰共同作用时, 磷酸化修饰对pH值的影响占主导作用, 并且亚硝基化可能会促进磷酸化对pH值的进一步影响; 相反, 蛋白质亚硝基化对宰后羊背最长肌肌原纤维内部结构的破坏起主要作用。当磷酸化和亚硝基化修饰共同存在时, 蛋白质磷酸化抑制蛋白质亚硝基化反应, 而蛋白质亚硝基化可能会促进蛋白质磷酸化对肌间线蛋白降解的抑制作用。在宰后孵育过程中, 蛋白质磷酸化和蛋白质亚硝基化在不同反应时期调控作用不同, 但最终均会使肌钙蛋白-T的降解程度下降。综上所述, 蛋白质磷酸化和亚硝基化修饰互作负向影响宰后羊肉嫩度。

关键词: 蛋白质磷酸化; 蛋白质亚硝基化; 肌原纤维蛋白降解; 嫩度

Effect of Interaction between Protein Phosphorylation and S-Nitrosylation on Mutton Tenderness during Postmortem Storage

DU Manting^{1,2,3}, GAO Mengli¹, YOU Ziyang¹, LI Ke^{1,2,3}, BAI Yanhong^{1,2,3,*}

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Henan Key Laboratory of Cold Chain Food Quality and Safety Control, Zhengzhou 450001, China;

3. Henan Province Collaborative Innovation Center of Food Production and Safety, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Postmortem mutton *longissimus dorsi* was minced and treated separately with phosphatase inhibitor, kinase inhibitor, S-nitrosoglutathione and nitric oxide synthase (NOS) inhibitor to control the degrees of phosphorylation and S-nitrosylation. The effect of interaction between protein phosphorylation and S-nitrosylation on mutton tenderness during postmortem storage were investigated by analyzing the changes in the phosphorylation level, S-nitrosylation level, pH, myofibrillar fragmentation index (MFI), desmin and troponin-T degradation of the treated mutton samples during storage at 4℃. The results indicated that phosphorylation levels were significantly higher ($P < 0.05$) in the phosphorylation-controlled group than in the phosphorylation and S-nitrosylation-controlled group in the early (0–12 h) and late (48–72 h) stages of storage, suggesting that protein S-nitrosylation inhibited its phosphorylation. When phosphorylation and S-nitrosylation modifications acted simultaneously, phosphorylation modification was dominant in affecting pH and its effect could be further enhanced by S-nitrosylation. On the contrary, S-nitrosylation played a major role in destroying the internal structure of myofibrillar proteins in mutton *longissimus dorsi*. When they occurred simultaneously, protein phosphorylation inhibited its S-nitrosylation; conversely, protein S-nitrosylation may promote the inhibitory effect of protein phosphorylation on desmin degradation. During postmortem storage, the interaction between protein phosphorylation and S-nitrosylation varied at different reaction periods, but both ultimately resulted in a decrease of troponin-T degradation. In conclusion,

收稿日期: 2023-04-17

基金项目: 河南省重大公益专项(201300110100); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31801612)

第一作者简介: 杜曼婷(1991—)(ORCID: 0000-0003-1842-9326), 女, 讲师, 博士, 研究方向为肉品科学。

E-mail: mantingdu@163.com

*通信作者简介: 白艳红(1975—)(ORCID: 0000-0002-2074-0351), 女, 教授, 博士, 研究方向为肉品加工与质量安全控制。

E-mail: baiyanhong212@163.com

the interaction between protein phosphorylation and *S*-nitrosylation negatively influences the tenderness of mutton during postmortem aging.

Keywords: protein phosphorylation; protein *S*-nitrosylation; myofibrillar protein degradation; tenderness

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230417-162

中图分类号: TS251.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0017-07

引文格式:

杜曼婷, 高梦丽, 游紫燕, 等. 蛋白质磷酸化和亚硝基化互作对宰后羊肉嫩度的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 17-23.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230417-162. <http://www.spkx.net.cn>

DU Manting, GAO Mengli, YOU Ziyang, et al. Effect of interaction between protein phosphorylation and *S*-nitrosylation on mutton tenderness during postmortem storage[J]. Food Science, 2024, 45(2): 17-23. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230417-162. <http://www.spkx.net.cn>

肉嫩度是重要的肉品质之一, 也是吸引消费者购买的主要因素^[1-2]。影响宰后肉嫩度的因素最主要的是肌原纤维蛋白和细胞骨架蛋白的降解^[3-4]。钙蛋白酶系统主要包括 μ -钙蛋白酶、*m*-钙蛋白酶和钙蛋白酶抑制蛋白, 其中, μ -钙蛋白酶参与宰后肌肉肌原纤维蛋白和细胞骨架蛋白的降解^[5-6], 对宰后肌肉的嫩化具有重要作用。在宰后复杂的生理生化变化过程中, 蛋白质翻译后修饰如磷酸化和亚硝基化会作用于 μ -钙蛋白酶或肌原纤维蛋白, 使其结构和功能发生变化, 进而影响 μ -钙蛋白酶的降解活性或肌原纤维蛋白对蛋白酶降解作用的敏感性, 导致肌原纤维蛋白和细胞骨架蛋白的降解程度发生改变, 最终影响宰后肉的嫩度。

研究表明, 低嫩度组羊肉肌原纤维蛋白的整体磷酸化水平高于高嫩度组, 肌原纤维蛋白的磷酸化差异大多数与肌肉收缩相关; 磷酸化会降低 μ -钙蛋白酶对肌原纤维蛋白的降解, 引起肌肉收缩, 降低肉嫩度^[7-10]。本团队前期研究了肌浆蛋白磷酸化对 μ -钙蛋白酶活性的影响, 发现 μ -钙蛋白酶的磷酸化负向调控其活性, 进一步研究了磷酸化对纯 μ -钙蛋白酶的活性调控机制, 发现磷酸化和去磷酸化均正向调控 μ -钙蛋白酶活性, 过高的温度和钙离子浓度会削弱磷酸化对 μ -钙蛋白酶的作用^[11-12]。Hou Qin等^[13]发现*S*-亚硝基谷胱甘肽(*S*-nitrosoglutathione, GSNO)处理会提高蛋白质的亚硝基化水平而一氧化氮合成酶抑制剂会降低蛋白质的亚硝基化水平, 并且蛋白质的亚硝基化会降低 μ -钙蛋白酶的自溶、肌原纤维蛋白和肌间线蛋白的降解、提高剪切力, 而去亚硝基化处理后结果相反, 表明蛋白质亚硝基化通过抑制 μ -钙蛋白酶自溶和肌原纤维蛋白降解降低肉嫩度。张朝阳^[14]也得到类似的研究结果。刘瑞^[15]在离体条件下对肌原纤维蛋白进行不同程度的亚硝基化修饰, 研究其对 μ -钙蛋白酶蛋白水解的敏感性, 结果发现, 肌原纤维蛋白的亚硝基化修饰使其对 μ -钙蛋白酶的敏感性发生改变, 抑制了肌钙蛋白-T的降解, 但促进肌间线蛋白的降解。

以上相关研究表明, 蛋白质磷酸化和蛋白质亚硝基化均会对宰后肉嫩度产生影响。在宰后肌肉成熟的过程中, 肌细胞会发生一系列复杂的生化变化, 蛋白质磷酸化和蛋白质亚硝基化往往会伴随这些变化同时发生, 或通过交互作用共同调控宰后肉嫩度。目前的研究主要集中在蛋白质磷酸化、蛋白质亚硝基化等单一翻译后修饰对宰后肉品质的影响, 而对蛋白质磷酸化和蛋白质亚硝基化如何交互调控共同作用于宰后肉品质的相关研究鲜有报道。因此, 本研究采用不同处理方式使宰后羊背最长肌获得不同程度的磷酸化和亚硝基化修饰水平, 通过探究不同水平磷酸化和亚硝基化处理对宰后羊背最长肌pH值、肌原纤维小片化指数(myofibrillar fragmentation index, MFI)、肌原纤维蛋白降解程度的影响, 明确蛋白质磷酸化和亚硝基化对宰后羊肉嫩度的交互影响作用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

选用3只10月龄的小尾寒公羊购自河南郑州荥阳某屠宰场, 饲养条件、生理成熟度等条件一致, 胴体质量约为25 kg。在宰后30 min内迅速取羊背最长肌, 剔除脂肪和肉眼可见的筋膜, 低温运输至实验室备用。

磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂 瑞士Roche公司; 激酶抑制剂 美国Abmole公司; GSNO、一氧化氮合成酶抑制剂(*NG*-nitro-*L*-arginine-methyl ester hydrochloride, *L*-NAME) 美国Sigma公司; 三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺 上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

T25高速匀浆机 德国IKA公司; TGL-20KR高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; Tecan-Spark-20M多功能微孔板检测仪 上海迪奥生物科技有限公司; Mini-PROTEAN Tetra电泳设备、Mini Trans-Blot转膜设备、

ChemiDoc™ XRS+凝胶成像仪、ChemiDoc™ MP凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司；Milli-Q® Reference超纯水系统 德国Merck Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

将同一只羊的双侧背最长肌切块混匀绞碎后随机均分成6个组，每组3次生物学重复。对照组(C)：向肉糜中添加等体积的生理盐水；高磷酸化水平组(P⁺)：向肉糜中添加磷酸酶抑制剂(每5 g样品中1片抑制剂)；低磷酸化水平组(P⁻)：向肉糜中添加激酶抑制剂(每5 g肉糜中添加0.144 μmol激酶抑制剂)；亚硝基化处理组(S⁺)：向50 g肉糜中添加50 mL 400 μmol/L的GSNO溶液；去亚硝基化处理组(S⁻)：向50 g肉糜中加入50 mL 0.1 mol/L L-NAME溶液；磷酸化和亚硝基化水平组(P⁺+S⁺)：向50 g肉糜中添加磷酸酶抑制剂(每5 g样品中1片抑制剂)和50 mL 400 μmol/L GSNO溶液。并在4 °C环境中孵育3 d，为保证宰后肉中的能量不被完全消耗，上述操作均在羊宰后40 min内完成。分别在宰后12、24、48、72 h取样，液氮速冻，于-80 °C贮藏备用。

1.3.2 肌原纤维蛋白提取

肌原纤维蛋白的提取参考Huang Honggang^[16]和Li Chunbao^[17]的方法，并稍作修改。1 g肉样与6 mL蛋白提取液(100 mmol/L Tris, pH 8.3)、1片蛋白酶抑制剂(50 mL/片)、2片磷酸酶抑制剂(25 mL/片)，在10 000 r/min条件下冰浴均质3次，每次30 s；然后4 °C、10 000×g离心30 min，弃上清液，将沉淀在8 mL体积分数为5% SDS溶液(60 °C)中匀浆30 s后，80 °C加热20 min，得到肌原纤维蛋白溶液，分装后液氮速冻，放置于-80 °C备用。

1.3.3 样品制备

用超纯水将肌原纤维蛋白溶液稀释20倍，BCA法测定肌原纤维蛋白质量浓度并用超纯水稀释至4 mg/mL。肌原纤维蛋白分离参考Chen Lijuan等^[7]的方法。制备好的肌原纤维蛋白与上样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、10 mmol/L二硫苏糖醇、40 g/L SDS、1 g/L 溴酚蓝、250 g/L甘油)等体积混合，混匀后沸水浴5 min，冷却至室温，于12 000 r/min离心2 min，取上清液分装，于-20 °C贮存备用。

1.3.4 磷酸化水平测定

采用体积分数4%浓缩胶和体积分数12%分离胶进行电泳，浓缩胶电压70 V，当条带到达分离胶时将电压调至110 V，并且当溴酚蓝指示条带到达距离凝胶底部0.5 cm时停止电泳。电泳结束后，参照Chen Lijuan等^[7]的染色方法，采用Pro-Q Diamond对磷酸化蛋白进行染色，SYPRO Ruby对全蛋白进行染色。先使用固定液(体积分数10%乙酸溶液，体积分数50%甲醇溶液)

固定凝胶1 h(30 min, 2次)后水洗30 min(10 min, 3次)，Pro-Q Diamond染色液避光孵育染色70 min，用Pro-Q脱色液(体积分数20%乙醇溶液，50 mmol/L乙酸钠，pH 4.0)避光脱色1 h(30 min, 2次)后水洗15 min(5 min, 3次)，采用凝胶成像仪扫描磷酸化蛋白染色条带。而后将凝胶用SYPRO Ruby染色液避光过夜染色，SYPRO Ruby脱色液(体积分数7%乙酸溶液，体积分数10%乙醇溶液)避光脱色1 h(30 min, 2次)后水洗15 min(5 min, 3次)，采用凝胶成像仪扫描全蛋白染色条带。使用Quantity One软件分析蛋白质磷酸化水平。蛋白质磷酸化水平为整体磷酸化蛋白光密度值(P)与全蛋白光密度值(T)的比值。

1.3.5 亚硝基化水平测定

参考Zhang Chaoyang等^[18]的方法略作修改，将羊背最长肌切碎并加入提取缓冲液(50 mmol/L NaCl和50 mmol/L NH₄HCO₃, pH 7.8)，12 000 r/min匀浆2次，每次30 s，8 000×g冷冻离心匀浆10 min，吸取上清液，用BCA试剂盒测上清液蛋白质量浓度，并用缓冲液将蛋白质量浓度稀释至1 mg/mL，然后进行亚硝基硫醇(S-nitrosothiol, SNO)含量测定。取50 μL蛋白溶液分别与溶液A(含1 g/100 mL磺胺的0.5 mol/L盐酸)和溶液B(含0.2 g/100 mL氯化汞的溶液A)等体积混合，室温避光反应5 min；然后加入100 μL溶液C(含0.02 g/100 mL N-(1-萘基)乙二胺二盐酸盐的0.5 mol/L盐酸)，室温(25 °C)避光反应5 min。用酶标仪测定混合物在540 nm波长处的吸光度。使用200 μmol/L的GSNO溶液倍比稀释至1.56 μmol/L，测得吸光度，绘制标准曲线。根据标准曲线方程，由溶液B和溶液A的吸光度差值计算SNO含量，单位为nmol/mg(以蛋白质质量计)。

1.3.6 pH值测定

参考GB 5009.237—2016《食品pH值的测定》^[19]，略作修改。取0.5 g肉糜，加入5 mL 0.1 mol/L KCl溶液，于12 000 r/min冰浴均质，测定均质液的pH值，每组样液测定3次平行。

1.3.7 MFI测定

参考Culler等^[20]的方法并略作修改。约0.5 g肌肉加入5 mL预冷缓冲液(100 mmol/L KCl、20 mmol/L K₂HPO₄、1 mmol/L 乙二胺四乙酸、1 mmol/L MgCl₂, pH 7.1)，匀浆2次，每次30 s，中间间隔1 min。匀浆液在4 °C、3 000×g条件下离心15 min，弃去上清液，用5 mL预冷缓冲液重悬，再次离心。再使用1.25 mL缓冲液将沉淀重悬，使用双缩脲法测定蛋白质量浓度。用缓冲液将蛋白质量浓度调至(0.50±0.05) mg/mL，使用紫外分光光度计测定540 nm波长处的吸光度。MFI按下式计算：

$$MFI = A_{540\text{ nm}} \times 200$$

1.3.8 肌原纤维蛋白降解测定

1.3.8.1 肌间线蛋白降解

采用体积分数4%的浓缩胶和体积分数12%的分离胶进行电泳,浓缩胶电压70 V,当指示条带到达分离胶时将电压调至110 V,并且当溴酚蓝指示条带到达距离凝胶底部0.5 cm时停止电泳。电泳结束后,去除浓缩胶并取下凝胶,于预冷的转膜缓冲液中平衡凝胶和PVDF膜20 min,平衡前将PVDF膜放在无水甲醇中活化15 s,按照黑板、黑海绵、滤纸、凝胶、PVDF膜、滤纸、黑海绵的顺序放置于预冷转膜缓冲液中,100 V冰浴60 min,结束后用Tris缓冲盐溶液(Tris buffered saline, TBS)(10 mmol/L Tris、150 mmol/L氯化钠, pH 7.5)清洗PVDF膜上的转膜缓冲液(3次,每次2 min),封闭液(含0.05%吐温-20、3%牛血清白蛋白的TBS)室温封闭2 h,一抗使用鼠抗-肌间线蛋白抗体(D1033,稀释比为1:1 000),在4℃孵育过夜(14 h)后用含0.1%吐温-20的TBS(TBS with 0.1% Tween-20, TBST1)洗涤(3次,每次20 min),然后与二抗(辣根过氧化酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白,稀释比为1:2 500)在室温孵育2 h后用TBST2(50 mmol/L Tris、150 mmol/L氯化钠、0.1%吐温-20, pH 7.5)洗涤(3次,每次10 min),与电学发光显色液避光孵育后用凝胶成像仪曝光成像。

1.3.8.2 肌钙蛋白-T降解

肌钙蛋白-T的降解测定方法同1.3.8.1节,但是其采用体积分数15%的分离胶,一抗是鼠抗-肌钙蛋白-T抗体(ab13003,稀释比为1:1 000)。

1.4 数据分析

实验均3次重复,每个样品3次平行,用SPSS 26.0和Origin 21.0软件对实验结果进行处理,采用单因素方差分析法对数据进行分析,利用Duncan方法对数据进行多重比较,其中 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 蛋白质磷酸化水平分析

不同处理组在不同孵育时间下的相对磷酸化水平变化如图1和图2所示,各处理组相对磷酸化水平随孵育时间的改变无显著变化。在孵育过程中,磷酸化处理组的相对磷酸化水平高于对照组,其他处理组的相对磷酸化水平则低于对照组,并且在宰后孵育前期(12 h)和后期(48~72 h),磷酸化处理组的磷酸化水平显著高于磷酸化和亚硝基化共同处理组($P < 0.05$),表明蛋白质亚硝基化会抑制磷酸化修饰反应。细胞外调节蛋白激酶的亚硝基化会抑制其磷酸化并导致细胞凋亡^[21]。但Guequen等^[22]

研究结果相反,可能是不同的研究对象具有不一样的作用效果。

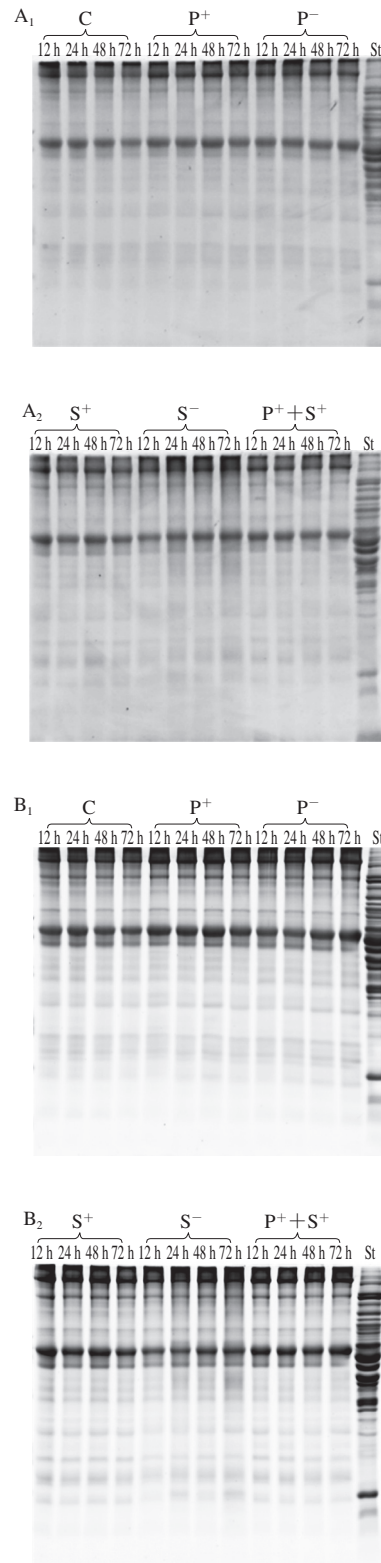
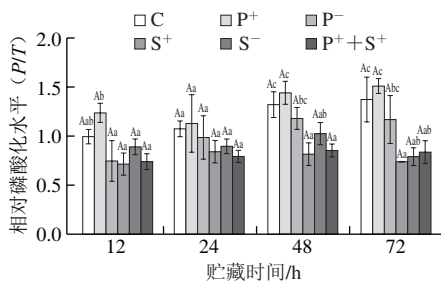


图1 Pro-Q磷酸化蛋白(A)和Ruby全蛋白(B)荧光染色图
Fig. 1 Fluorescent staining gel images of phosphorylated myofibrillar protein with Pro-Q diamond (A) and total protein with SYPRO Ruby (B)



不同小写字母表示相同时间各组间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一组在不同时间下差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

图2 宰后各组在不同孵育时间下的相对磷酸化水平

Fig. 2 Relative phosphorylation level of each group at different times of postmortem storage

2.2 蛋白质亚硝基化水平分析

SNO含量越高, 表明其蛋白质亚硝基化程度越大。由图3可知, 不同处理组的SNO含量随孵育时间的延长发生显著改变 ($P < 0.05$)。在孵育过程中, 不同处理组间SNO含量差异显著 ($P < 0.05$), 对照组、亚硝基化处理组和去亚硝基化处理组的亚硝基化水平显著升高 ($P < 0.05$), 而磷酸化处理组的亚硝基化水平却显著降低 ($P < 0.05$), 亚硝基化处理组的SNO含量显著高于对照组, 磷酸化与亚硝基化共同处理组的SNO含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 磷酸化处理组则在孵育中后期 (24~72 h) 低于对照组, 磷酸化与亚硝基化共同处理组的SNO含量在反应前期和中期 (12~48 h) 均显著低于磷酸化处理组, 孵育后期 (72 h) 则显著高于磷酸化处理组 ($P < 0.05$), 表明蛋白质磷酸化能够抑制蛋白质亚硝基化反应。Chen Yong等^[23]研究发现磷酸化Dexas1导致铁流量减少, 是因为Dexas1的磷酸化抑制了其亚硝基化水平, 与本研究的结果一致。

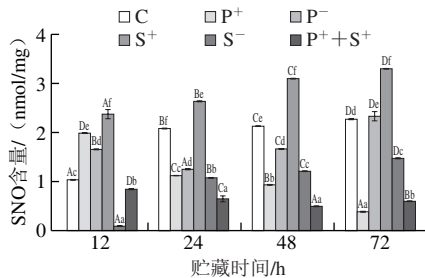


图3 宰后各组在不同孵育时间下的相对亚硝基水平

Fig. 3 Relative S-nitrosylation level of each group at different times of postmortem storage

2.3 pH值分析

pH值是反映宰后肉成熟进程的重要指标^[24]。由图4可知, 在孵育过程中, 去亚硝基化处理组的pH值随着孵育时间的延长显著降低 ($P < 0.05$), 直至趋于稳定, 一氧化氮合酶抑制剂通过减少肌肉细胞中NO含量、加速

糖酵解的进程, 促进pH值下降^[25]。磷酸化处理组样品的pH值先显著升高后显著降低直至趋于稳定, 可能是磷酸酶抑制剂促使磷酸基团进入磷酸化修饰位点导致溶液体系pH值减小, 而后由于磷酸化水平的升高加速了糖酵解进程^[26]。对照组、去磷酸化处理组、亚硝基化处理组和磷酸化与亚硝基化共同处理组的pH值则是先降低后升高直到趋于稳定, 这是无氧糖酵解产生的乳酸、蛋白质被降解产生的碱性物质以及NO含量共同调控的结果^[27]。当磷酸化和亚硝基化修饰共同作用时, 磷酸化修饰对pH值的影响占主导作用, 并且亚硝基化可能会促进磷酸化对pH值的进一步影响。

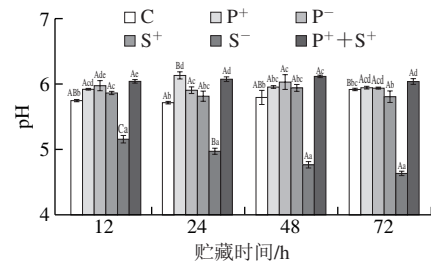


图4 宰后各组在不同孵育时间下的pH值

Fig. 4 pH of each group at different times of postmortem storage

2.4 MFI分析

MFI是表征宰后肉嫩度的重要指标^[28-29]。MFI越大, 肌原纤维结构被破坏得越严重, 肌原纤维蛋白降解程度越大, 肉嫩度越好^[30-31]。由图5可知, 在整个孵育过程中, 亚硝基化处理组、磷酸化与亚硝基化共同处理组的MFI均小于对照组, 并且从孵育24 h起, 磷酸化处理组的MFI也低于对照组。在孵育前期 (12 h) 和后期 (48~72 h), 磷酸化处理组的MFI显著大于磷酸化与亚硝基化共同处理组 ($P < 0.05$), 且亚硝基化处理组与磷酸化和亚硝基化共同处理组差异不显著, 表明与蛋白质磷酸化相比, 亚硝基化对宰后羊背最长肌肌原纤维内部结构的破坏起主要作用。

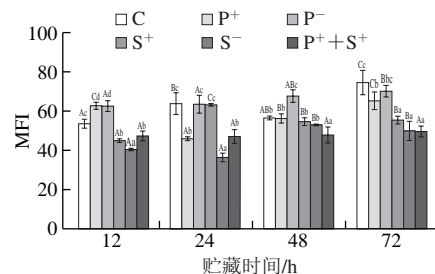


图5 宰后各组在不同孵育时间下的MFI

Fig. 5 MFI of each group at different times of postmortem storage

2.5 肌原纤维蛋白降解分析

2.5.1 肌间线蛋白降解

肌间线蛋白可作为宰后蛋白降解的标志蛋白^[32]。如

图6B所示,在整个孵育过程中,去磷酸化处理组和亚硝基化处理组的肌间线蛋白相对降解率始终高于对照组,但在孵育72 h时,去磷酸化处理组肌间线蛋白的降解程度低于对照组,而在孵育过程中肌间线蛋白相对降解率一直低于对照组的去亚硝基化处理组却在此刻略高于对照组;磷酸化处理组和磷酸化与亚硝基化共同处理组的肌间线蛋白相对降解率在宰后羊背最长肌孵育成熟过程中均低于对照组,且在孵育中后期(24~72 h),磷酸化与亚硝基化共同处理组肌间线蛋白的降解程度从显著低于磷酸化处理组($P<0.05$)最终变化至差异不显著($P>0.05$)。这表明蛋白质亚硝基化会促进肌间线蛋白的降解,而蛋白质磷酸化抑制肌间线蛋白的降解,且当二者共同存在时,蛋白质磷酸化抑制蛋白质亚硝基化修饰进程,而蛋白质亚硝基化相反可能会促进蛋白质磷酸化对肌间线蛋白降解的抑制作用。

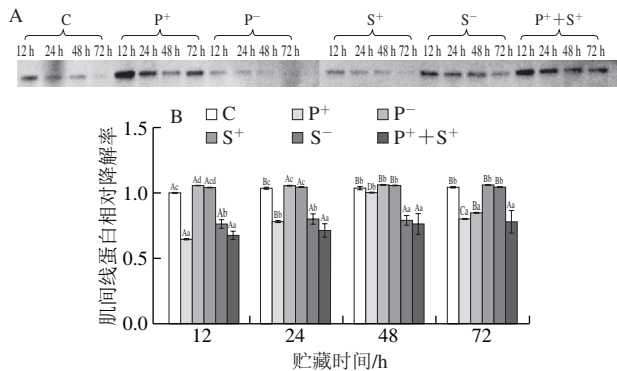


图6 宰后各组在不同孵育时间下的肌间线蛋白免疫印迹图(A)和相对降解率(B)

Fig. 6 Western blot image (A) and relative degradation rate (B) of desmin in each group at different times of postmortem storage

2.5.2 肌钙蛋白-T降解

肌钙蛋白-T降解是宰后肉嫩化和成熟的标志^[33]。由图7可知,在整个孵育过程中,磷酸化与亚硝基化共同处理组的肌钙蛋白-T降解程度始终显著低于对照组($P<0.05$),亚硝基化处理组也低于对照组,但在孵育72 h显著高于对照组。在宰后孵育的12 h内,各处理组肌钙蛋白-T的相对降解率均低于对照组,但在24~72 h孵育过程中,磷酸化处理组、去磷酸化处理组以及去亚硝基化处理组肌钙蛋白-T的降解程度显著高于对照组($P<0.05$),磷酸化与亚硝基化共同处理组的肌钙蛋白-T相对降解率则始终低于亚硝基化处理组。表明在宰后孵育前期(12 h),蛋白质磷酸化和蛋白质亚硝基化修饰相互促进,抑制肌钙蛋白-T的降解。在孵育中期(24~48 h),蛋白质亚硝基化抑制磷酸化反应进程,而磷酸化促进亚硝基化修饰对肌钙蛋白-T降解的抑制作用。在孵育后期(72 h),蛋白质磷酸化和蛋白质亚硝基化相互抑制,导致肌钙蛋白-T的降解程度明显降低。

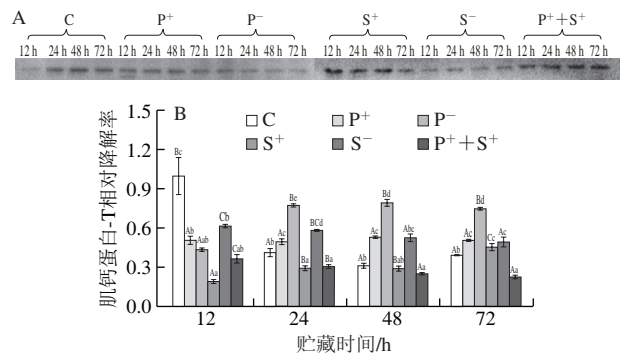


图7 宰后各组在不同孵育时间下的肌钙蛋白-T免疫印迹图(A)和相对降解率(B)

Fig. 7 Western blot image (A) and relative degradation rate (B) of troponin-T in each group at different times of postmortem storage

3 结论

采用不同处理方式调控宰后羊背最长肌的磷酸化和亚硝基化修饰水平,结果表明,蛋白质磷酸化和亚硝基化修饰反应可能相互抑制;当磷酸化和亚硝基化修饰共同作用时,磷酸化修饰主要影响pH值的变化,并且亚硝基化会促进磷酸化对pH值的进一步影响;与蛋白质磷酸化相比,蛋白质亚硝基化对宰后羊背最长肌肌原纤维内部结构的破坏起主要作用;当磷酸化和亚硝基化修饰共同存在时,蛋白质磷酸化抑制蛋白质亚硝基化反应,而蛋白质亚硝基化相反可能会促进蛋白质磷酸化对肌间线蛋白降解的抑制作用;在宰后孵育前期(12 h),蛋白质磷酸化和蛋白质亚硝基化修饰相互促进,在孵育中期(24~48 h),蛋白质磷酸化促进亚硝基化反应进程,而亚硝基化抑制磷酸化反应进程,在孵育后期(72 h),蛋白质磷酸化和蛋白质亚硝基化相互抑制,最终导致肌钙蛋白-T的降解程度明显降低。蛋白质磷酸化和亚硝基化修饰互作不利于宰后羊肉嫩度。

参考文献:

- [1] O'QUINN T G, LEGAKO J F, BROOKS J C, et al. Evaluation of the contribution of tenderness, juiciness, and flavor to the overall consumer beef eating experience[J]. *Translational Animal Science*, 2018, 2(1): 26-36. DOI:10.1093/tas/txx008.
- [2] RAMANATHAN R, SUMAN S P, FAUSTMAN C. Biomolecular interactions in postmortem skeletal muscles governing fresh meat color: a review[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(46): 12779-12787. DOI:10.1021/acs.jafc.9b08098.
- [3] HUFF-LONERGAN E, ZHANG W G, LONERGAN S M. Biochemistry of postmortem muscle-lessons on mechanisms of meat tenderization[J]. *Meat Science*, 2010, 86(1): 184-195. DOI:10.1016/j.meatsci.2010.05.004.
- [4] WU G, FAROUKM M, CLERENS S, et al. Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness[J]. *Meat Science*, 2014, 98(4): 637-645. DOI:10.1016/j.meatsci.2014.06.010.

- [5] LI X, ZHANG D Q, REN C, et al. Effects of protein posttranslational modifications on meat quality: a review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 20(1): 289-331. DOI:10.1111/1541-4337.12668.
- [6] BISWAS A K, TANDON S, GIRI A K, et al. Role of calpain system in post-mortem tenderization of meat and its influence on quality: a review[J]. *Indian Journal of Poultry Science*, 2016, 51(2): 123-131. DOI:10.5958/0974-8180.2016.00048.9.
- [7] CHEN L J, LI X, NI N, et al. Phosphorylation of myofibrillar proteins in post-mortem ovine muscle with different tenderness[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(5): 1474-1483. DOI:10.1002/jsfa.7244.
- [8] LI X, CHEN L J, HE F, et al. A comparative analysis of phosphoproteome in ovine muscle at early postmortem in relationship to tenderness[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(13): 4571-4579. DOI:10.1002/jsfa.8326.
- [9] 王颖, 李欣, 李铮, 等. 不同钙离子浓度体外条件下磷酸化对肌联蛋白降解的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(16): 52-57. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180920-211.
- [10] 陈立娟, 李欣, 李铮, 等. 蛋白质磷酸化调控羊肉肌原纤维蛋白的功能[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(7): 1360-1370. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2016.07.012.
- [11] 杜曼婷. 蛋白质磷酸化介导的 μ -钙蛋白酶活性变化机理[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018: 21-35.
- [12] DU M T, LI X, LI Z, et al. Phosphorylation regulated by protein kinase A and alkaline phosphatase play positive roles in μ -calpain activity[J]. *Food Chemistry*, 2018, 252: 33-39. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.01.103.
- [13] HOU Q, ZHANG C Y, ZHANG W G, et al. Role of protein S-nitrosylation in regulating beef tenderness[J]. *Food Chemistry*, 2020, 306: 125616. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125616.
- [14] 张朝阳. 蛋白质亚硝基化对牛肉成熟过程中品质的影响研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018: 41-56. DOI:10.27244/d.cnki.gnjnu.2018.000674.
- [15] 刘瑞. 一氧化氮在猪肉成熟过程中的作用机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018: 127-142. DOI:10.27244/d.cnki.gnjnu.2018.000380.
- [16] HUANG H G, LARSEN M R, KARKLSSON 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. DOI:10.1002/pmic.201100173.
- [17] LI C B, ZHOU G H, XU X L, et al. Phosphoproteome analysis of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in bovine longissimus muscle in response to postmortem electrical stimulation[J]. *Food Chemistry*, 2015, 175: 197-202. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.11.139.
- [18] ZHANG C Y, LIU R, WANG A R, et al. Regulation of calpain-1 activity and protein proteolysis by protein nitrosylation in postmortem beef[J]. *Meat Science*, 2018, 141: 44-49. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.03.017.
- [19] 国家卫生和计划生育委员会. 食品pH值的测定: GB 5009.237—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [20] CULLER R D, SMITH G C, CROSS H R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle[J]. *Journal of Food Science*, 1978, 43(4): 1177-1180. DOI:10.1111/j.1365-2621.1978.tb15263.x.
- [21] FENG X J, SUN T Z, BEI Y C, et al. S-Nitrosylation of ERK inhibits ERK phosphorylation and induces apoptosis[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1): 1814. DOI:10.1038/srep01814.
- [22] GUEQUEN A, CARRASCO R, ZAMORANO P, et al. S-Nitrosylation regulates VE-cadherin phosphorylation and internalization in microvascular permeability[J]. *AJP-Heart and Circulatory Physiology*, 2016, 310(8): 1039-1044. DOI:10.1152/ajpheart.00063.2016.
- [23] CHEN Y, MATHIAS L, FALERO-PEREZ J M, et al. PKA-mediated phosphorylation of Dexas1 suppresses iron trafficking by inhibiting S-nitrosylation[J]. *FEBS Letters*, 2015, 589(20): 3212-3219. DOI:10.1016/j.febslet.2015.08.041.
- [24] 李兰会, 张宏鑫, 李潭清, 等. 宰后肉品pH值变化与嫩度的关系[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2008(5): 25-26. DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2008.05.002.
- [25] ZHANG L L, LIU R, CHNEG Y P, et al. Effects of protein S-nitrosylation on the glycogen metabolism in postmortem pork[J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 613-618. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.08.103.
- [26] LI M, LI X, XIN J Z, et al. Effects of protein phosphorylation on color stability of ground meat[J]. *Food Chemistry*, 2017, 219: 304-310. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.09.151.
- [27] ZHANG L T, LI Q, HONG H, et al. Search for proteomic markers for stunning stress and stress-induced textural tenderization in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) filets using label-free strategy[J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109678. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109678.
- [28] 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. DOI:10.2527/1995.7351351x.
- [29] 孙红霞, 黄峰, 丁振江, 等. 不同加热条件下牛肉嫩度和保水性的变化及机理[J]. *食品科学*, 2018, 39(1): 84-90. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201801013.
- [30] DANG D S, BUHLER J F, DAVIS H T, et al. Inhibition of mitochondrial calcium uniporter enhances postmortem proteolysis and tenderness in beef cattle[J]. *Meat Science*, 2020, 162: 108039. DOI:10.1016/j.meatsci.2019.108039.
- [31] 孙金龙, 师希雄, 黄峰, 等. 藏羊肉宰后成熟过程中热休克蛋白27对肌原纤维蛋白及细胞凋亡酶的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(3): 24-29. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181203-038.
- [32] LIU R, LONERGAN S, STEADHAM E, et al. Effect of nitric oxide on myofibrillar proteins and the susceptibility to calpain-1 proteolysis[J]. *Food Chemistry*, 2019, 276: 63-70. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.10.005.
- [33] 王颖, 李欣, 李铮, 等. 极限pH对羊肉宰后成熟过程中肌原纤维蛋白特性的影响[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(2): 13-18. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2019.02.003.