

畜禽宰后肌肉嫩化相关酶研究进展

李晶晶, 张瑞红, 韩冬雪, 俞龙浩*

(黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘 要: 目前普遍认为参与宰后肌肉嫩化的相关蛋白酶主要有溶酶体组织蛋白酶、蛋白酶体、钙激活蛋白酶、钙激活酶抑制蛋白和半胱天冬酶5种, 然而对于成熟过程中肉的嫩化程度及机理颇具争议。大量的研究表明, 上述5种嫩化酶在参与肉嫩化过程中其自身生理生化特性在宰后也发生变化。本文综述5种参与宰后肉嫩化酶的分子质量、存在部位、作用底物、作用位点、激活条件、最适pH值以及对其活性具有一定影响的抑制剂, 并就其影响宰后肉嫩度的作用机理及其自身状态的变化进行分析与阐述, 旨在为后续研究嫩化酶在宰后改善肉嫩度方面的应用条件提供参考。

关键词: 宰后嫩化; 蛋白酶; 生理生化

Advances in Research on Endogenous Proteolytic Enzymes for Postmortem Tenderization of Livestock and Poultry Meat

LI Jingjing, ZHANG Ruihong, HAN Dongxue, YU Longhao*

(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: The mechanism of postmortem tenderization of muscle has been controversial for years. It is generally accepted that the improvement of meat tenderness mainly results from five endogenous proteolytic enzymes, including lysosomal cathepsin, proteasome, calpain, calpastatin and caspase. Calpains were widely considered to be a major contributor; however the latest studies reveal the role of caspases in muscle tenderness. The molecular weights, distribution, substrates, action sites, activation conditions, optimum pH and inhibitors of five enzymes involved in meat tenderization are briefly reviewed in this paper. The possible activation pathways and transformation ways of the enzymes are also discussed with the aim of providing a guideline for the application of these proteolytic enzymes to improve meat tenderness.

Key words: postmortem tenderization; protease; physiological and biochemical properties

中图分类号: R337.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)15-0240-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201515044

畜禽宰后肌肉在贮藏过程中发生生理生化变化, 嫩度和风味随之逐渐改善, 进而将肌肉转变为肉。在所有的肉的特性中, 嫩度是与食用品质有关的最重要的因素^[1], 也是消费者对肉品质最为直接的感官评价标准。大量研究表明, 肉的最最终嫩度取决于宰后肌肉结构及各类肌蛋白变化程度^[2]。总体来讲, 肉的嫩化过程就是一个在内源酶的作用下肌纤维结构和结合蛋白结构的完整性减弱的过程。在肉的僵直成熟过程中, 参与肉嫩化过程的酶系统^[3-4]主要为钙激活蛋白酶系统和溶酶体组织蛋白酶系统, 其中在畜禽动物宰后初期, 通常主要考虑钙激活蛋白酶系统对肉嫩度的影响。然而肉的嫩化过程及程度并不仅是由单一的蛋白水解酶系统决定的, 而是由一个多酶复合体系共同参与完成的。本文介绍溶酶体组织蛋白酶、蛋白酶体、钙激活蛋白酶、钙激活酶抑制蛋白和半胱天冬

酶5种嫩化酶, 重点阐述这5种嫩化酶的生理生化特性及宰后变化, 以期探明这5种蛋白酶是否可以进一步参与宰后肉的嫩化过程及其影响程度提供参考依据。

1 溶酶体组织蛋白酶

溶酶体组织蛋白酶是由肽链外切酶和肽链内切酶组成的一组酶, 属于天冬氨酸和丝氨酸蛋白酶家族系统^[5]。包括半胱氨酸型组织蛋白酶B (cathepsin B)、天冬氨酸型组织蛋白酶D (cathepsin D)、组织蛋白酶H (cathepsin H) 和组织蛋白酶L (cathepsin L) 4种类型。

Cathepsin B分子质量范围为23~29 kD, 大部分存在于肝脏溶酶体中, 以N-苄酯基-L-精氨酸-L-精氨酸-7-酰胺基-4-甲基香豆素为底物进行催化。其活性的表现需要半

收稿日期: 2014-11-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31171712)

作者简介: 李晶晶 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肉品科学与技术。E-mail: 591388563@qq.com

*通信作者: 俞龙浩 (1962—), 男, 教授, 博士, 研究方向为肉品科学与技术。E-mail: yu2058@sohu.com

胱氨酸或者2-巯基乙醇存在, 后者的激活效果没有前者好。作用位点为肌浆中的肌球蛋白、肌动蛋白以及肌原纤维骨架中的肌钙蛋白-T。Cathepsin B的抑制剂有碘醋酸、氨基碘乙酰、TLCK、TPCK及E64等。Cathepsin B活性最适pH值在5.5~6.0左右, 最适的温度是37℃。

Cathepsin D存在于大部分肌肉溶酶体中, 可以使用ESO10 (MCA-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-DPA-Ala-Arg-NH₂)和酸变性牛血红蛋白作为底物。作用位点有肌联蛋白、肌球蛋白、C-蛋白、M-蛋白、肌动蛋白、肌钙蛋白-T、肌钙蛋白-I及原肌球蛋白, 另外抑肽素对组织蛋白酶D有独特的专一性抑制作用。Cathepsin D活性在pH值为3.0~4.5、压力520 MPa、260 s、温度为10℃条件下最高。

Cathepsin H分子质量为28 kD, 存在于骨骼肌溶酶体中, 底物为N-苄酯基-L-精氨酸-7-酰胺基-4-甲基香豆素。其作用位点是肌球蛋白, 当pH值为7.0, 温度到达20℃时有最高作用效果。

Cathepsin L分子质量为24 kD, 位于骨骼肌溶酶体中, 作用底物为N-苄酯基-苯丙氨酸-精氨酸-7-酰胺基-4-甲基香豆素。作用位点有肌球蛋白重链、肌动蛋白、肌钙蛋白-T及 α -辅肌动蛋白。最适pH值在5.5左右。当以肌球蛋白为底物, pH值为4.1时活性最高。Cathepsin L的抑制剂有亮肽素和抗蛋白酶。

组织蛋白酶居于全身各处肌浆液的溶酶体中, 在肾、脾、肝脏中含量较高, 骨骼肌中含量较少。在畜禽肉宰后pH值小于7, 因此在正常情况下cathepsin H不能降解肌原纤维蛋白。Ouali等^[6]认为cathepsin D在pH值小于5的情况下可以对肌原纤维蛋白有降解的作用, 但是在宰后肌肉的成熟过程中所达到的pH值的极限为5.5, 此条件下cathepsin D对肌原纤维的降解能力很小。

目前研究最为广泛的是cathepsin B、cathepsin L, 也是通常被认为参与宰后肉嫩度的2个重要的蛋白酶。Appaiahgari^[7]、Cruzen^[8]和张瑞红^[9]等发现在宰后成熟阶段较高温度和较低pH值能加快溶酶体的裂解, 使溶酶体破裂, 释放出cathepsin B, 继而参与宰后肉的分解。但在宰后肉的成熟过程中, 所达到的pH值极限为5.5左右, 达不到溶酶体破裂所需要的pH 5的条件。Iwanowska等^[10]对牛肉嫩度的研究表明, 在宰后成熟8 h, cathepsin B和cathepsin L参与宰后牛的嫩化, cathepsin L降解肌联蛋白、原肌球蛋白、伴肌动蛋白、以及肌钙蛋白-T、C以及I, 这些符合宰后成熟时发生的肌原纤维降解模式。而且与Mikami等^[11]对兔肉、鸡肉以及牛肉的背最长肌的组织蛋白酶L是否参与宰后肉的嫩化过程的研究结果相一致。

通过宰后肌肉生理生化水平, 根据研究数据分析, 由于宰后pH值的极限为5.5, 宰后肌肉中的cathepsin B是否能从溶酶体中破裂出来, 作用于肌原纤维, 目前尚存

在争议^[12]。另外, 从肌肉宰后的作用底物来看, 肌浆中没有大规模的cathepsin B的作用底物分解, 因而不能立即得出cathepsin B是否参与宰后肌肉的嫩化的结论。目前大多数研究者宰后肌肉生理变化水平上的研究结果表明, cathepsin L有可能参与宰后肌肉嫩化, 同时也得出结论: cathepsin L的活性程度与肉的种类无关。鉴于目前对于组织蛋白酶是否参与宰后肉的嫩化过程还是不确定的, 需要进一步的研究和探讨。

2 蛋白酶体

蛋白酶体是所有真核生物中负责清除细胞内垃圾, 除了溶酶体以外的一种水解体系, 对蛋白质的降解通过泛素进行传递, 又称为泛素降解途径。泛素是由76个氨基酸组成的小肽, 它的作用主要是识别要被降解的蛋白质, 然后将这种蛋白质送入蛋白酶体中心进行降解。蛋白酶体对蛋白质的降解分为两个过程: 一是对被送入到蛋白酶体中心的蛋白质进行标记, 由泛素完成; 二是蛋白酶解作用, 又叫做蛋白酶体催化^[13]。

蛋白酶体的组分形式通常根据蔗糖梯度离心法测定的斯维德伯格沉降系数(以“S”来标记)来命名, 最普遍的蛋白酶体的组分形式是26S蛋白酶体, 其分子质量约为2 000 kD, 包括1个20S核心颗粒和2个19S调节亚基颗粒。已知20S是一种多催化蛋白酶复合体, 分子质量为750 kD, 是这些蛋白酶体复合物的催化核心, 具有催化蛋白质水解酶活性。19S调节亚基中含有多个ATP酶活性位点和泛素结合位点, 用来识别多泛素化的蛋白质, 并将它们传送到核心颗粒中, 进行催化降解。

蛋白酶体在体内普遍存在, 并且大量存在于骨骼肌中。蛋白酶体中包含糜蛋白酶、胰蛋白酶、谷氨酰胺水解酶、支链氨基酸以及小中性的氨基酸。由于在20S核心颗粒中主要包含3个活性位点 β -1、 β -2和 β -5, 而这3个活性位点分别对应负责糜蛋白酶、胰蛋白酶与谷氨酰胺水解酶的活性, 因此在宰后畜禽肌肉中研究应用最为广泛的为糜蛋白酶、胰蛋白酶和谷氨酰胺水解酶。这3种蛋白酶的3种特异性水解底物都具有细胞通透性, 当它们进入细胞后, 对底物的特异氨基酸链进行识别, 并可以进一步对底物的特异氨基酸链进行切割, 被切割后的底物释放出游离的发光基团, 可以通过荧光进行监测这些蛋白酶是否参与畜禽肌肉宰后的变化。

在生理条件下, 蛋白酶体在细胞内主要负责降解各种结构异常、短生命周期的蛋白质, 是非溶酶体蛋白质降解途径中的重要蛋白酶。多数学者认为蛋白酶体能够参与牛^[14-17]、猪等大型物种的宰后肉嫩化过程, 而对于较小的物种, 如羊^[18]、小鼠^[19]等, 许多学者对此提出质疑。目前对于蛋白酶体是否参与宰后肉的嫩化过程及其

是否与物种相关尚未定论, 仍需进一步研究, 但是并不能排除蛋白酶体参与宰后蛋白质降解的可能。

3 钙激活蛋白酶系统

钙激活蛋白酶也叫钙激活中性蛋白酶, 简称钙激活酶, 是目前肉类科学中可能研究最为广泛的蛋白酶家族。并且大多数人都接受钙激活酶系统参与肉嫩化的学说^[3]。钙激活酶是细胞内半胱氨酸蛋白酶的一个大家族。在骨骼肌中, 钙激活酶分为 μ -calpain, m -calpain和calpastatin 3种。

钙激活酶(calpain)是一种钙催化蛋白酶, 需要 Ca^{2+} 激活。当 Ca^{2+} 浓度为微摩尔级别时, μ -calpain被激活, 当 Ca^{2+} 浓度为毫摩尔级别时, m -calpain被激活。其中 μ -calpain和 m -calpain位于骨骼肌内部, 肌原纤维的Z线连接处, 具有一个28 kD的小亚基和一个80 kD的大亚基, 作用位点有肌钙蛋白-T、肌联蛋白、肌间线蛋白(Z线)、连接蛋白、原肌球蛋白以及伴肌动蛋白^[10]。当 μ -calpain达到半数活性时, Ca^{2+} 浓度约为5~50 $\mu\text{mol/L}$, m -calpain达到半数活性时, Ca^{2+} 浓度约为250~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 。 m -calpain最适的pH值范围为6.1~7.5。由于细胞内 Ca^{2+} 的波动在微摩尔浓度水平以下, 所以认为 μ -calpain可能在正常生理条件下发挥功能, 而 m -calpain则可能在细胞内钙超载等病理条件下被激活^[20-22]。

Huff等^[23]用calpain体外培养肌原纤维, 降解了主要肌纤维蛋白, 包括伴肌动蛋白、肌联蛋白、肌钙蛋白-T以及结蛋白, 这与体内肌原纤维降解模式相同。另外, Boehm等^[24]研究发现宰后牛肉中激活 μ -calpain所需要的 Ca^{2+} 浓度比 m -calpain活化所需要的浓度低, 因此宰后牛肉中 μ -calpain先被激活。然而Geesink等^[25]将小鼠基因中的 μ -calpain基因敲除后, 观测到蛋白质的水解程度大幅度下降, 但是, 也观测到还有大部分的蛋白质降解, 这表明可能是由于其他蛋白酶对蛋白质分解起到了作用。

钙激活酶抑制蛋白(calpastatin)是与calpain相关的特异性内源性抑制剂, 位于骨骼肌内部^[26], 肌原纤维的Z线连接处, 分子质量为130 kD。当 Ca^{2+} 浓度小于5~50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 能够与calpain结合, 抑制calpain活性, 同时本身可降解分裂成100 kD和70 kD的片段。其最适pH值为6.1左右, 当 $\text{pH}<5.5$ 时, 抑制作用减弱。Calpastatin对 μ -calpain及 m -calpain活性的抑制作用依赖于 Ca^{2+} 浓度, 激活calpastatin所需要的 Ca^{2+} 浓度接近或低于激活 μ -calpain所需要活化的浓度。如果被激活的calpain附近有calpastatin存在, calpastatin将迅速与calpain结合来抑制calpain的活性^[27]。此外, calpastatin与calpain的这种结合是可逆的, Ca^{2+} 浓度不足时两者会自动发生分离。与嫩度

相关性最高的是calpastatin与 μ -calpain的活性比值, 比值越小肉的嫩化效果越好^[28-29]。

畜禽屠宰后, 机体正常生理条件遭到破坏, 温度和pH值下降会造成calpain系统的酶活性下降。但是, 肌肉内ATP能量逐渐消失和pH值下降又会使内质网破裂, 升高细胞中 Ca^{2+} 浓度, 这又会大幅度地激活calpain系统中蛋白酶的活性。本研究团队通过酪蛋白酶谱法测定宰后肌肉不同处理对calpain活性的变化发现, μ -calpain在处理组之间没有差异, 这可能是由于calpastatin抑制了 μ -calpain的活性结果。从而推测引起两种不同处理组之间产生的显著嫩化差异可能是 μ -calpain以外的某种酶引起的结果(此研究结果待发表)。至于那些酶引起宰后肌肉不同处理组之间的嫩化差异以及其作用机理还有待进一步研究。

4 半胱天冬酶家族系统

尽管有相当多的证据表明在宰后早期calpain系统的活性影响肉最终嫩度, 同时也表明这不是肉品质蛋白水解唯一的决定因子^[30]。近年来有研究学者提出半胱天冬蛋白酶(Caspase)可能对畜禽动物宰后肉的嫩化具有一定的作用。Caspase是半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶族。迄今为止, 半胱天冬酶家族的14名成员(1~12以及mICH 3和mICH 4)已经被鉴定出来。

Caspase-1, 作用位点YVAD, 作用底物为pro-IL-1、pro-caspase-3、pro-caspase-4。醛化的YVAD(AC-YVAD-CHO)是Caspase-1的特异可逆抑制剂, 酰酮化YVAD(Ac-YVAD-CMK)是特异性不可逆抑制剂。当Caspase-1的天冬氨酸位点的2个亚基连接区被切割后, 产生异二聚体, Caspase-1才具有活性。Caspase-2的分子质量为48 kD, 能使作用底物PARP(116 kD)分解成31 kD和85 kD; Caspase-3的分子质量为32 kD, 作用底物为PARP、DNA-pk、SRE、BP、rho-GDI、kc, 作用位点是DEAD; Caspase-6作用底物为LaminA, 作用位点是VEID; Caspase-7的分子质量为35 kD, 作用底物为PARP、pro-caspase-6, 作用位点是DEV D; Caspase-8的分子质量55 kD, 作用底物为pro-caspase 3、4、7、9、10, 作用位点是DEV D; Caspase-9的分子质量为46 kD, 作用底物为PARP; Caspase-10的分子质量为55 kD, 作用位点是YVAD; Caspase-11的分子质量为42 kD。

目前只有以上7个Caspase酶被确定参与细胞凋亡途径, 这些酶在最初都是以无活性酶原形式存在, 因此需要通过水解其氨基端一段序列而进一步激活。

Caspase家族成员大多数是细胞凋亡的启动子或效应子, 在细胞凋亡过程中发挥重要作用。Earnshaw等^[31]认为Caspase-2、8、9、10作为Caspase酶的启动子,

Caspase-3、6和7是Caspase效应子,在细胞死亡途径上起作用。Boatright等^[32]报道激活Caspase主要通过3个方式:1)细胞死亡途径,也称外部途径,当细胞表面受体受到激发,与此同时Caspase-8和Caspase-10启动子启动,两者通过这种方式活化,随后激活下游的Caspase-3效应子,最终使肉达到嫩化。2)内在途径,当在缺氧和甲磺双氢麦角胺应激的条件下Caspase-9启动子受到活化,随后激活下游Caspase-3效应子,使肉被嫩化,这与Earnshaw等^[31]研究的相近。3)内质网介导途径,也叫ER介导路径。内质网中有特异性蛋白酶Caspase-12,当内质网受到外界刺激时,被激活的Caspase-12能直接激活Caspase-9,进而诱导细胞凋亡,参与肉嫩化过程^[33-35]。

Kemp等^[36]证实了Caspase在体外能模拟畜禽动物体内原位蛋白酶分解肌原纤维蛋白,促使宰后肌原纤维的分解作用的增加,通过分析鉴定这些蛋白水解物,发现分别为肌动蛋白、肌钙蛋白-T和肌球蛋白轻链。当用Caspase-3的人工合成抑制剂(Ac-DEVD-CHO)与Caspase家族一起体外培养肌原纤维蛋白时,则观察不到结蛋白和肌钙蛋白-T的明显降解作用,说明Caspase参与宰后肉嫩度变化。随后在宰后早期用Caspase-3抑制剂培养calpastatin时,抑制calpastatin本身分解,表明Caspase-3促进了calpastatin分解,也可以在某种程度上说明在宰后早期calpastatin分解的越多,Caspase激活程度越大^[37]。因此,如果Caspase家族酶在畜禽宰后成熟期有活性,则可以通过将calpastatin水解来影响肉的嫩度,同时可能增加calpain的活性,从而提高肉的嫩度。

5 结 语

Sentandreu等^[5]认为畜禽肉最终嫩度是由宰后蛋白质的变化程度和肌纤维断裂程度所决定,已有很多研究证实calpain酶系统参与宰后蛋白质水解过程。同时有不少研究表明calpastatin在肉嫩化过程中起到了重要的作用。并且畜禽物种之间以及宰后肌肉不同处理之间,参与宰后嫩化过程的主要贡献酶可能有所不同。根据前人研究牛、羊、小鼠物种间的蛋白酶体活性研究发现,不同物种间存在着蛋白酶体活性差异。另外,本研究团队进行了畜禽动物宰后成熟过程肌肉不同处理,发现calpain以及Caspase之间存在着很大的差异,相关机理有待于进一步研究和发表成果。因此,对于畜禽动物相关的蛋白酶,除了从这些相关酶的内部生理生化性状考虑是否可以参与宰后肌肉嫩化过程之外,还可以从改变外部条件是否可以进一步促进宰后肌肉的嫩化过程这一方面考虑。

在考虑蛋白酶体参与宰后肉嫩化过程同时,考虑从畜禽物种以及体积方面做深入的研究,像Caspase系统这样的其他特异性蛋白水解体系,可以从内部本身溶酶体破裂的条件、底物的分解程度、以及Caspase与calpain、calpastatin之间的关系进行探讨。

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 tenderising meat[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(13): 2727-2740.
- [2] XUE Mei, HUANG Feng, HUANG Ming, et al. Influence of oxidation on myofibrillar proteins degradation from bovine via μ -calpain[J]. Food Chemistry, 2012, 134(1): 106-112.
- [3] 季宏飞, 卢进峰, 蔡克周, 等. 复合嫩化剂对猪肉嫩化效果的研究[J]. 肉类研究, 2010, 24(4): 13-17.
- [4] NISHIMURA T. The role of intramuscular connective tissue in meat texture[J]. Animal Science Journal, 2010, 81(1): 21-27.
- [5] SENTANDREU M A, COULIS G, OUALI A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness[J]. Trends in Food Science and Technology, 13(12): 400-421.
- [6] OUALI A, HERRERA-MENDEZ C H, COULIS G, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms[J]. Meat Science, 2006, 74(1): 44-58.
- [7] APPAIAHGARI M B, VRATI S. Clinical development of IMOJEV®-a recombinant Japanese encephalitis chimeric vaccine (JE-CV)[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2012, 12(9): 1251-1263.
- [8] CRUZEN S M, PAULINO P V R, LONERGAN S M, et al. Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle[J]. Meat Science, 2014, 96(2): 854-861.
- [9] 张瑞红, 安玥, 孟质文, 等. 宰后不同温度处理对鹅肌肉理化特性的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2013, 25(6): 62-66.
- [10] IWANOWSKA A, GRZEŚ B, MIKOŁAJCZAK B, et al. Impact of polymorphism of the regulatory subunit of the μ -calpain (CAPN1S) on the proteolysis process and meat tenderness of young cattle[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(2): 1295-1300.
- [11] MIKAMI M, WHITING A H, TAYLOR M A J. Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin I and lysosomal lysates[J]. Meat Science, 1987, 21(2): 81-97.
- [12] GIUSTI J, CASTAN E, dal PAI M, et al. Expression of genes related to quality of *Longissimus dorsi* muscle meat in Nellore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*) cattle[J]. Meat Science, 2013, 94(2): 247-253.
- [13] 陈茂营, 徐文方. 蛋白酶体与蛋白酶体抑制剂[J]. 中国药物化学杂志, 2007, 17(4): 249-253.
- [14] LAMARE M, TAYLOR R G, FAROUT L, et al. Changes in proteasome activity during postmortem aging of bovine muscle[J]. Meat Science, 2002, 61(2): 199-204.
- [15] LEE S H, JOO S T, RYU Y C. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality[J]. Meat Science, 2010, 86(1): 166-170.
- [16] NOWAK D. Enzymes in tenderization of meat-the system of calpains and other systems: a review[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2011, 61(4): 231-237.
- [17] 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.
- [18] PANDURANGAN M, HWANG I. The role of calpain in skeletal muscle[J]. Animal Cells and Systems, 2012, 16(6): 431-437.
- [19] 陈晓勤, 潘小芬, 谢军. 蛋白酶体活性测定与组分分析方法的建立[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50): 9374-9377.
- [20] 梅承君, 庞辉, 康相涛, 等. 钙蛋白酶系统研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(22): 5774-5776.

- [21] RODRIGUEZ J, UNRUH J, VILLARREAL M, et al. Carcass and meat quality characteristics of Brahman cross bulls and steers finished on tropical pastures in Costa Rica[J]. *Meat Science*, 2014, 96(3): 1340-1344.
- [22] MUROYA S, NEATH K E, NAKAJIMA I, et al. Differences in mRNA expression of calpains, calpastatin isoforms and calpain/calpastatin ratios among bovine skeletal muscles[J]. *Animal Science Journal*, 2012, 83(3): 252-259.
- [23] LONERGAN E H, ZHANG Wangang, LONERGAN S M. Biochemistry of postmortem muscle: lessons on mechanisms of meat tenderization[J]. *Meat Science*, 2010, 86(1): 184-195.
- [24] BOEHM M L, KENDALL T L, THOMPSON V F, et al. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle[J]. *Journal of Animal Science*, 1998, 76: 2415-2434.
- [25] GEESINK G H, KUCHAY S, CHISHTI A H, et al. Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84: 2834-2840.
- [26] 刘安芳, 朱庆. 钙蛋白酶抑制蛋白可抑制屠宰后肌肉蛋白水解[J]. *动物科学与动物医学*, 2005, 22(8): 62-64.
- [27] 王广银. 钙蛋白酶系统与肉嫩度调控的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(1): 57-58.
- [28] CAMPBELL R L, DAVIES P L. Structure function relationships in calpains1[J]. *Biochemical Journal*, 2012, 447(3): 335-351.
- [29] STORR S J, CARRAGHER N O, FRAME M C, et al. The calpain system and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(5): 364-374.
- [30] 李小艳, 包素珍. Caspase家族的研究进展[J]. *内蒙古中医药*, 2012, 31(2): 107.
- [31] EARNSHAW W C, MARTINS L M, KAUFMANN S H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1999, 68: 383-424.
- [32] BOATRIGHT K M, SALVESEN G S. Mechanisms of caspase activation[J]. *Current Opinion Cell Biology*, 2003, 15(6): 725-731.
- [33] SALVESEN G S, ASHKENAZI A. Snapshot: caspases[J]. *Cell*, 2011, 147(2): 476.
- [34] RIKKA S, QUINSAY M N, THOMAS R L, et al. Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2010, 18(4): 721-731.
- [35] KEMP C M, SENSKY P L, BARDSLEY R G, et al. Tenderness-an enzymatic view[J]. *Meat Science*, 2010, 84(2): 248-256.
- [36] KEMP C M, WHEELER T L. Effects of manipulation of the caspase system on myofibrillar protein degradation *in vitro*[J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(10): 3262-3271.
- [37] HUANG Feng, HUANG Ming, ZHANG Hong, et al. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during postmortem ageing of beef skeletal muscle[J]. *Food Chemistry*, 2014, 148: 1-6.