

基于蛋白质组学技术研究秦川牛肉宰后贮藏过程中肌红蛋白含量及其衍生物转化

张杏亚¹, 杨波², 李亚蕾^{1,*}, 罗瑞明¹, 阮振甜¹, 撒苗苗¹, 赵珺怡¹

(1.宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2.宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 本实验采用4D-非标记蛋白质组学技术研究秦川牛肉贮藏过程中(0~8 d)肌红蛋白含量及其衍生物的转化情况, 阐释冷却秦川牛肉中肌红蛋白含量及其衍生物转化的分子机制。结果表明: 贮藏过程中, 肌红蛋白表达量在宰后0~4 d上升、4~8 d下降, 利用非标记蛋白质组学技术鉴定出与肌红蛋白及其衍生物相关的差异蛋白14种, 具体包括代谢酶、氧化还原酶、过氧化物酶、伴侣蛋白4类, 这4类蛋白的表达共同调控贮藏过程中肌红蛋白含量的变化及其3种衍生物之间的转化, 具体表现为贮藏过程中肌红蛋白表达量整体呈下降趋势, 氧合肌红蛋白相对含量持续下降, 脱氧肌红蛋白、高铁肌红蛋白相对含量逐渐增加, 导致肉色发生褐变。本研究结果有利于理解秦川牛肉贮藏过程肉类变色的复杂生化变化机制。

关键词: 秦川牛肉; 肌红蛋白; 肌红蛋白衍生物; 4D-非标记蛋白质组学; 肉色

Proteomics Studies on Myoglobin Content and Its Transformation into Derivatives in Muscle of Qinchuan Cattle during Postmortem Storage

ZHANG Xingya¹, YANG Bo², LI Yalei^{1,*}, LUO Ruiming¹, RUAN Zhentian¹, SA Miaomiao¹, ZHAO Junyi¹

(1. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In this paper, 4D-label-free proteomics (4D-LFQ) was used to explore changes in the content of myoglobin and its transformation into derivatives in the *Longissimus dorsi* muscle in Qinchuan cattle during the first eight days of postmortem storage. The results showed that during storage from day 0 to day 4, the expression of the myoglobin had an upward trend, but then decreased. Totally 14 differentially expressed proteins related to myoglobin and its derivatives were identified, including metabolic enzyme, oxidoreductase, peroxidase and chaperone protein, which could together regulate the change in myoglobin content and the transformation between myoglobin and its three derivatives. Specifically, myoglobin expression showed an overall downward trend, and the relative content of oxymyoglobin continuously declined, while the relative contents of deoxymyoglobin and metmyoglobin gradually rose, resulting in browning in meat color. The results of this study will be useful for understanding the complex biochemical mechanism underlying color changes in the meat of Qinchuan cattle during storage.

Keywords: meat of Qinchuan cattle; myoglobin; myoglobin derivatives; 4D-label-free proteomics; meat color

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200315-239

中图分类号: TS251.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2021)07-0226-06

引文格式:

张杏亚, 杨波, 李亚蕾, 等. 基于蛋白质组学技术研究秦川牛肉宰后贮藏过程中肌红蛋白含量及其衍生物转化[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 226-231. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200315-239. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Xingya, YANG Bo, LI Yalei, et al. Proteomics studies on myoglobin content and its transformation into derivatives in muscle of Qinchuan cattle during postmortem storage[J]. Food Science, 2021, 42(7): 226-231. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200315-239. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2020-03-15

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31660442); 宁夏回族自治区重点研发项目(2017BY068)

第一作者简介: 张杏亚(1995—)(ORCID: 0000-0001-5672-5826), 女, 硕士研究生, 研究方向为畜产品加工与贮藏。

E-mail: 1253015059@qq.com

*通信作者简介: 李亚蕾(1966—)(ORCID: 0000-0001-5245-9188), 女, 教授, 硕士, 研究方向为畜产品加工与贮藏。

E-mail: yaleili.cn@163.com

肉色及其稳定性代表着肉品的新鲜程度和品质,影响消费者对可接受性及鲜肉货架期的评判。目前,影响肉色稳定性的因素主要为两种:环境因素(如温度、pH值、微生物、氧气分压等)和内部因素(肌红蛋白的自氧化速率、高铁肌红蛋白还原酶活性、脂肪氧化、线粒体氧消耗率等)^[1]。肖蕾等^[2]模拟了大目金枪鱼的冷链流通过程,分析了流通期间的温度波动对大目金枪鱼肉色稳定性与氧化性能的影响,结果表明红度同总酚浓度、铁离子抗氧化能力、硫代巴比妥酸值,高铁肌红蛋白相对含量与酶活性等显著相关,肉色稳定性与氧化性能指标随温度波动而变化显著。张同刚等^[3]研究了冷鲜牛肉贮藏过程中贮藏时间对线粒体功能结构变化的影响,结果表明线粒体膜电位与线粒体呼吸控制率、ATP含量均呈正相关,与高铁肌红蛋白相对含量呈极显著负相关,线粒体结构、功能变化与肉色稳定性有密切的关系。目前,国内外对肉色及肌红蛋白衍生物转化的研究已逐步从外部因素的影响转向细胞及分子层面的研究。应用组学技术分析肌细胞及线粒体呼吸链中物质变化对具有运输和储存O₂功能的肌红蛋白的影响,可进一步揭示肌红蛋白含量及其衍生物占比变化的分子机制。

Wu Shuang等^[4]应用非标记蛋白质组学研究黑切牛肉的颜色和颜色稳定性,结果表明黑切牛肉具有较低的红度和较高的颜色稳定性,这是由于其具有较高的脱氧肌红蛋白含量、较高的耗氧量、较高的高铁肌红蛋白还原性和较低的脂质氧化作用。蛋白质组学在肉类科学研究方面的应用主要集中在肉品质研究上,非标记蛋白质组定量技术是一种不依赖于同位素标记的新型蛋白质定量技术,在3D蛋白质组学中,质谱会根据保留时间、质荷比、离子强度3个维度的性质对肽段离子进行鉴定和定量。4D蛋白质组学则是在3D分离的基础之上增加了第四维度,即离子淌度的分离,为复杂体系样品的测定带来了更多的可能。

秦川牛是我国陕甘宁地区的优势特色畜种,2015年以来年均存栏数约300万头,年均出栏数约100万头,年均肉产量约50万t^[5]。秦川牛肉质细致、肉味浓郁、瘦肉率高、营养全面,深受消费者喜爱。本实验以秦川牛背最长肌为研究对象,利用4D-非标记蛋白质组学(4D-label-free proteomics, 4D-LFQ)方法,测定宰后贮藏过程中肌红蛋白表达量及差异蛋白质变化,筛选出与肌红蛋白及其3种衍生物占比变化有关的差异蛋白质。利用拉曼光谱法检测肌红蛋白3种衍生物的含量,测定贮藏过程中牛肉肉色变化。从贮藏期间蛋白质组学的变化阐释冷却秦川牛肉中肌红蛋白含量及向其衍生物转化的分子机制,为理解肉类变色的复杂生化变化,研发秦川牛肉贮藏加工中肉色变化预测及调控技术提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

秦川黄牛(48月龄左右,生长发育良好、胴体质量约400 kg)由中国甘肃省泾川县旭康食品有限责任公司提供。屠宰后进行胴体修整,用水冲洗后,取牛背最长肌作为实验材料。

乙腈(色谱纯) 美国Fisher Chemical公司;二硫苏糖醇、尿素、碘代乙酰胺 美国Sigma公司;甲酸(色谱纯) 美国Fluka公司;胰酶 美国Promega公司;蛋白酶抑制剂 美国Calbiochem公司;BCA试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

CR-410便携式色差仪 日本柯尼卡美能达公司;UV-1200紫外分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;Inspector 300拉曼光谱仪 美国赛普斯公司;NanoElute液相色谱分析仪、timsTOF Pro质谱仪 德国布鲁克公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

样本取自3头秦川黄牛,每头牛取3个平行样本,各取样3次,共27个样品,所有肌肉样本均切成厚度3 cm的牛排,置于泡沫塑料托盘中,用聚乙烯薄膜(透气率:23.5 g/(m²·d))包覆,再贮存于0~5℃的冰箱中,将27个样品分为3组,分别在贮藏0、4、8 d后取出,立即在液氮中冷冻2 h,在-80℃冰箱中保存,以备后续检测分析。

1.3.2 肌红蛋白及其相关蛋白表达量的测定

此部分分为蛋白质提取、胰酶酶解、液相色谱-质谱检测3个步骤,具体实验委托杭州景杰生物科技有限公司进行。

数据库搜索:二级质谱数据使用Maxquant(v1.6.6.0)软件进行检索。检索参数设置:数据库为Bos_taurus_9913_PR_20190915.fasta(37 948条序列),为计算随机匹配造成的假阳性率需要添加反库,为消除鉴定结果中污染蛋白质的影响,加入常见的污染库;酶切方式设置为Trypsin/P;漏切位点数设为2;肽段最小长度设置为7个氨基酸残基;肽段最大修饰数设为5;First search和Main search的一级母离子质量误差容忍度均设为40×10⁻⁶,二级碎片离子的质量误差容忍度为0.04 Da。将半胱氨酸烷基化设置为固定修饰,可变修饰为甲硫氨酸的氧化,蛋白N端的乙酰化。蛋白鉴定、PSM鉴定的假阳性率都设置为1%。

1.3.3 拉曼光谱测定肌红蛋白相对含量

参照张同刚等^[6]的方法,基于拉曼光谱仪测定样品的拉曼光谱,用2D shige软件对图谱进行处理后计算脱氧肌红蛋白(myoglobin, DeoMb)、氧合肌红蛋白(oxy myoglobin, OxyMb)、高铁肌红蛋白(metmyoglobin, MetMb)的相对含量。

1.3.4 肉色测定

用便携式色差仪测定*L**值(亮度)、*a**值(红度)与*b**值(黄度),仪器在测定前用白盘进行校准,提供3个平行样(3 cm×3 cm×3 cm),每个样品需在肉表面的6个位置进行测定,取平均值。

1.4 数据处理分析

实验数据使用Excel软件进行处理作图,采用SPSS软件进行Duncan多重比较检验差异显著性,其中*P*<0.05表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 秦川牛肉宰后贮藏过程中肌红蛋白表达量变化

表1 秦川牛肉宰后贮藏过程中肌红蛋白表达量变化
Table 1 Changes in myoglobin expression in meat of Qinchuan cattle during postmortem storage

蛋白质 登录号	蛋白质 名称	4 d/0 d 差异倍数	8 d/4 d 差异倍数	8 d/0 d 差异倍数
P02192	肌红蛋白	1.145	0.815	0.933

宰后肌肉贮藏过程中,肉色主要由肌红蛋白的含量以及存在状态决定的。秦川牛肉宰后0~5℃条件下贮藏过程中肌红蛋白表达量变化结果如表1所示。在贮藏0~4 d,肌红蛋白表达量上调1.145倍,肌肉中总肌红蛋白含量处于较高的水平,可能是因为低氧条件下肌红蛋白在细胞水平逐渐发生系统适应^[7]。在4~8 d的贮藏中,肌红蛋白表达量下调0.815倍。在0~8 d贮藏过程中肌红蛋白总体基因表达量呈下降趋势。Yin Shuang等^[8]的研究指出,肌红蛋白由一条球蛋白链和血红素辅基组成,贮藏期间肌红蛋白的初级结构可能会改变,导致氧化还原性质不稳定。部分牛肉肌红蛋白可能会因发生氧化还原等反应而结构解体,且解体速率大于表达速率。

2.2 秦川牛宰后贮藏中与肌红蛋白及其衍生物相关蛋白的差异表达

本实验采用无标记质谱法测定了秦川黄牛宰后贮藏过程中蛋白质组的变化。使用无标记质谱技术鉴定了1 149个蛋白质,以1.2倍的差异倍数,鉴定出120个差异显著的蛋白质。筛选出与肌红蛋白及其衍生物相关的差异蛋白14种,按其功能可分为代谢酶、氧化还原酶、过氧化物酶、伴侣蛋白4类。这些蛋白质在贮藏期间差异表达量变化见表2。

表2 秦川牛肉宰后贮藏过程中与肌红蛋白及其衍生物相关的差异蛋白表达情况

Table 2 Differentially expressed proteins related to myoglobin and its derivatives in meat of Qinchuan cattle during postmortem storage

蛋白种类	蛋白质 登录号	蛋白质名称	基因名称	蛋白表达量差异倍数		
				4 d/0 d	8 d/4 d	8 d/0 d
代谢酶	A0A3Q1MIY8	烯醇化酶	ENO2	0.700*	1.086	0.761**
	P10096	甘油酸-3-磷酸脱氢酶	GAPDH	0.800*	1.019	0.815
	P00570	腺苷酸激酶同工酶1	AK1	0.840	0.798	0.671*
	P05631	线粒体ATP合酶(ATPSF1C)	ATPSF1C	1.298	1.217	1.579*
	P05630	线粒体ATP合酶(ATPSF1D)	ATPSF1D	1.819**	1.819	1.516*
	Q148D5	琥珀酸辅酶A合成酶亚基	SUCLA2	0.948	0.804*	0.762**
氧化 还原酶	Q01321	细胞色素c氧化酶(NDUFA4)	NDUFA4	1.222	0.637**	0.779
	Q02366	NADH脱氢酶1-亚基6(NDUFA6)	NDUFA6	1.467*	0.938	1.376
	Q02380	NADH脱氢酶1-亚基5(NDUFB5)	NDUFB5	0	0.497*	0
过氧 化物酶	A0A3Q1M5R4	乳酸脱氢酶	LDHB	1.690	0.866	0.866**
	Q5E947	过氧化物还原酶	PRDX1	0.639*	1.289*	0.824
	P41976	超氧化物歧化酶(含Mn)	SOD2	1.090	0.738*	0.805
伴侣 蛋白	F1MWU9	热休克蛋白家族A(HSP70)	HSPA6	0.804	0.804*	0.804**
	Q5EAC6	Hsp90伴侣蛋白CDC37	CDC37	0.834	1.261*	1.051

注:*.差异显著(*P*<0.05);**.差异极显著(*P*<0.01)。下同。

2.2.1 代谢酶

烯醇化酶(enolase, ENO2)是参与糖酵解代谢的重要限速酶,参与糖酵解途径中的第9步反应,催化2-磷酸甘油酸与高能化合物磷酸烯醇丙酮酸相互转化,控制糖分分解速率,是唯一的糖酵解脱水步骤^[9]。糖酵解途径在产生能量和供给生物合成前体中起着主要作用^[10]。本实验发现,ENO2在贮藏0~4 d表达量下调0.700倍,4~8 d上调1.086倍,变化不显著,0~8 d,ENO2表达量总体呈下调趋势,ENO2表达量下调0.761倍,导致磷酸烯醇式丙酮酸盐含量降低,因而抑制了线粒体的代谢速率,影响细胞进行次级代谢,而罗培等^[11]指出畜禽屠宰后线粒体能够促进褐变肉MetMb的还原,导致牛肉在贮藏过程中MetMb含量增加。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)传统上被认为是参与能量生成的管家蛋白^[12],主要参与糖酵解的第6步反应,催化甘油醛-3-磷酸转化为1,3-二磷酸甘油酸和NADH释放出能量^[13]。辛建增^[14]研究表明甘油醛-3-磷酸在肉中GAPDH的催化作用下生成的NADH能够直接被用于还原MetMb,进而延缓了MetMb的累积,从而提高肉色稳定性。在贮藏0~4 d时,GAPDH在牛肉中表达量下调0.800倍,4~8 d上调1.019倍,0~8 d,GAPDH表达量总体下调0.815倍,GAPDH表达水平下调抑制了糖酵解作用,使生成的NADH含量下降,导致MetMb中的三价铁还原成二价铁的量减少,进而导致累积MetMb。

琥珀酸辅酶A合成酶在柠檬酸循环中起作用,参与催化琥珀酸辅酶A的水解与ATP的合成^[15]。琥珀酸辅酶A合成酶亚基(succinyl-CoA synthetase, SUCLA2)在0~8 d表达量下调0.762倍,赵裕君^[16]指出SUCLA2的缺乏可以

引起神经元的线粒体膜电位崩溃,并且SUCLA2表达量下降可以抑制线粒体融合及分裂蛋白表达,使线粒体动力学失衡,从而导致线粒体氧化磷酸化效率受损。

腺苷酸激酶同工酶1(adenylate kinase isoenzyme 1, AK1)含有3个结构域,是最典型的酶分子机器,腺苷酸激酶的主要功能是在 Mg^{2+} 的作用下,催化两分子ADP生成一分子AMP和一分子ATP的可逆反应,使ATP保持在适当浓度^[17-18],维持机体能量平衡;在这个过程中, Mg^{2+} 与ADP进行选择性的结合,与 Mg^{2+} 结合的磷酸根氧原子逐渐被水分子取代,表现出配体交换过程^[19]。本实验中AK1的表达量在0~8 d贮藏过程中呈下降趋势,下调0.671倍,使活性位点水分子氢键网络的结构和动力学发生变化,影响糖酵解过程中底物的脱离过程和酶催化效率,导致ATP含量下降。

ATP5F1D、ATP5F1C分别表示ATP合酶亚基 δ 基因和ATP合酶亚基 γ 基因。线粒体ATP酶利用质子电化学梯度的能量,通过ADP和Pi合成ATP,这是细胞内代谢途径的主要能量来源^[20]。本实验中,随着贮藏时间的延长,ATP5F1D、ATP5F1C表达量一直增加,ATP5F1D、ATP5F1C在第8天时表达量比第0天时分别上调1.516、1.579倍,导致关键酶ATP合成酶不能正常发挥应有的功能,细胞不能正常交换能量,这是宰后细胞能量代谢紊乱的重要原因。

2.2.2 氧化还原酶

NDUFA6和NDUFB5是线粒体膜呼吸链NADH脱氢酶I的副亚基,它们具有将电子从NADH转移到呼吸链的功能^[21],共同调控NADH脱氢酶的活性,而NADH脱氢酶可使稳定肉色的甲基血红蛋白、高铁肌红蛋白、高铁细胞色素b5和高铁细胞色素c含量降低^[22]。NDUFA6的表达量在0~4 d上调1.476倍,第8天与第4天相比,表达量变化不大,NDUFB5在第0天没有检测到,第4~8天表达量下调,不利于维持肉色稳定。

乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDHB)能够可逆地催化丙酮酸转变为乳酸,使NADH脱去电子变为 NAD^+ 。有研究表明,NADH积累越多,肌红蛋白的自氧化速率也越高^[23],并且研究发现LDHB在低温长期贮藏中极不稳定且容易失去活性^[24],本实验中4~8 d贮藏过程中LDHB表达量下调,间接影响肉色。

细胞色素c氧化酶(NDUFA4)具有NADH脱氢酶和氧化还原酶的双重活性,它在NADH和呼吸链间的电子传递中起着重要的生理作用,以维持和促进细胞内生物氧化的进行,并最终推动ATP合成以提供生命能量活动的需要^[25]。NDUFA4是的过表达引起细胞色素c的相对表达量显著升高,导致细胞线粒体凋亡^[26]。实验中NDUFA4表达量先上调后下调,说明宰后贮藏中细胞能量代谢紊乱。

2.2.3 过氧化物酶

过氧化物酶还原酶(peroxiredoxin, PRDX1)是过氧化物酶家族的成员之一,可以保护OxyMb免受过氧化物的攻击^[27],从而作为抗氧化蛋白来保护肉色。本实验中在贮藏4~8 d时,PRDX1表达量上调1.289倍,可以看作肌肉对肉色褐变的‘抵抗’。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)2可以破坏在细胞内产生并对生物系统有毒的超氧阴离子自由基,避免对细胞有害的过氧化氢的形成,从而维持了肌红蛋白氧化还原态比例的稳定^[28]。SOD2在0~4 d表达量基本不变,4~8 d表达量呈下降趋势,贮藏后期SOD2的低表达表明,随着贮藏时间延长,肌红蛋白的氧化态和还原态比例不稳定。

2.2.4 伴侣蛋白

HSPA6是热休克蛋白家族A(HSP70)成员6。热休克蛋白对于细胞在应对突变和不利的变化时的生存具有重要的作用。HSPA6通过形成铁螯合物和产生氧化应激,保护细胞免受过氧化氢的损伤。Hsp90伴侣蛋白CDC37通过与细胞内多种靶点蛋白组成为复合体,协助靶点蛋白转运、跨膜,参与蛋白质的折叠、伸展及组装多聚体,维持细胞内蛋白质稳定^[29]。Joseph等^[30]也发现了两种热休克蛋白(HSP-70 kDa和HSP-27 kDa)在具有颜色稳定性的牛腰长肌肉中含量过高;而在本实验中,HSPA6在贮藏8 d时比贮藏0 d时表达量下调0.804倍,说明颜色稳定性可能下降。CDC37在贮藏0~4 d下调0.834倍,4~8 d上调1.216倍。伴侣蛋白HSPA6、CDC37表达量的改变可能参与了保护蛋白质不变性,从而起到维持细胞内蛋白质稳定的作用。

2.3 秦川牛肉宰后贮藏过程中3种肌红蛋白相对含量的变化

为进一步验证2.1、2.2节中蛋白质组学分析结果,本研究测定了牛肉贮藏期间3种肌红蛋白的实际相对含量变化,主要包括使肉呈现不同颜色的OxyMb(鲜红色)、DeoMb(紫红色)和MetMb(灰褐色)^[31],不同肌红蛋白衍生物之间相互转化会引起肉品色泽的变化^[32]。

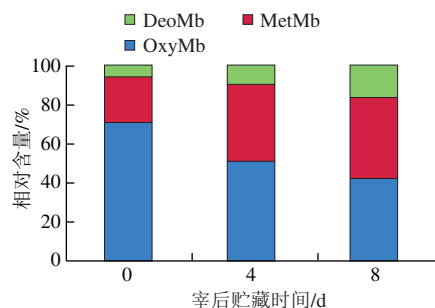


图1 秦川牛肉宰后贮藏过程中3种肌红蛋白相对含量

Fig. 1 Relative contents of three myoglobin derivatives in meat of Qinchuan cattle during postmortem storage

如图1所示,在宰后0 d,肉表面以OxyMb为主时(相对含量70.84%),肉呈现鲜红色。贮藏过程中,OxyMb相对含量明显下降,MetMb、DeoMb逐渐积累,在8 d时,OxyMb、MetMb、DeoMb相对含量依次为40.92%、40.22%、18.86%。在贮藏过程中,氧气含量逐渐降低,OxyMb转化成DeoMb,然后DeoMb氧化成MetMb,使暗褐色的MetMb相对含量增加,肉色褐变。Wang Zhaoming等^[33]研究发现血红素蛋白在贮藏过程中发生降解、被破坏或卟啉与球蛋白的分离。张同刚等^[34]指出随着贮藏时间的延长,蛋白质二级结构中的 α -螺旋转化成 β -折叠或无规卷曲结构,发生分子重排,造成肌红蛋白二级结构原始构象改变,由规整向松散转化,分子间的部分二硫键受到破坏,从而导致其分子间的作用力减弱,肌红蛋白结构的稳定性下降,最终导致肌红蛋白作为色素蛋白的特有功能减弱乃至丧失,肌红蛋白在牛肉中的相对含量下降,与本研究贮藏过程中肌红蛋白表达量下调的结果一致。

2.4 秦川牛肉宰后贮藏过程中的肉色变化

表3 不同宰后贮藏时间对秦川牛肉肉色的影响

Table 3 Effect of postmortem storage time on Qinchuan cattle meat color

色差值	贮藏时间/d		
	0	4	8
L^*	30.50 ± 0.56^a	35.95 ± 0.38^b	34.86 ± 0.22^b
a^*	23.77 ± 0.34^c	18.62 ± 0.27^b	10.27 ± 0.52^a
b^*	12.46 ± 0.59^a	12.81 ± 0.74^a	14.87 ± 0.48^b

注:同行肩标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

宰后牛肉贮藏过程中颜色发生了显著变化,这与之前的研究结果^[35]一致。 L^* 值越高则肉类的颜色越亮,如表3所示,在8 d的贮藏过程中, L^* 值呈先上升后缓慢下降趋势; a^* 值显著降低,到第8天下降至10.27; b^* 值呈缓慢上升趋势,这可能是由于贮藏中与肌红蛋白相关的14种蛋白质表达量发生变化,影响了细胞正常的能量代谢,肌红蛋白衍生物的占比发生变化,MetMb的逐渐累积,肉色发生褐变。这与以上肌红蛋白及其衍生物的含量变化相一致。

3 讨论

肌肉中肌红蛋白是红色素的主要成分,其含量及3种衍生物占比直接影响肉色变化。肌红蛋白是水溶性的球蛋白与卟啉环结合的中心配体, Fe^{2+} 存在于血红素残基中,铁原子与 O_2 、H、O、NO分子容易结合^[36]。由于其特殊的结构,肌红蛋白可以输送氧气,供机体组织器官产生能量。肌红蛋白的表达量变化及蛋白结构的变化影响氧气运输和能量代谢,进而造成肉色的改变。肌红蛋白绝对含量一方面取决于肌红蛋白表达量;另一方面取决于肌红蛋白由于结构解体引起的消亡量。实验中

肌红蛋白表达量在贮藏0~4 d呈略微上升趋势,4~8 d呈下降趋势,整体呈下降趋势。随着宰后牛肉贮藏时间的延长,牛肉中肌红蛋白二级结构原始构象发生改变,结构由规整向松散转化,肌红蛋白分子间的部分二硫键受到破坏,导致其分子间的作用力降低,肌红蛋白结构的稳定性下降,最终导致肌红蛋白作为色素蛋白的特有功能下降乃至自身消亡。本实验研究的与肌红蛋白表达及其衍生物转化相关的差异蛋白中,ENO2、GAPDH、SUCLA2等蛋白质调控糖酵解代谢途径,AK1、ATP5F1D、ATP5F1C等蛋白质共同调控ATP的生成,NADH脱氢酶、NDUFA4、LDHB等氧化还原酶参与线粒体电子传递链,由于肌红蛋白的血红素残基中铁原子是呼吸链中的电子受体,这几种氧化还原酶的表达量变化影响了肌红蛋白衍生物之间的相互转化。PRDX1与SOD2可以保护OxyMb免受过氧化物的攻击,维持肌红蛋白氧化还原物比例的稳定,这两种过氧化物酶在牛肉贮藏中表达量下降,可能导致OxyMb相对含量降低,MetMb相对含量上升。

4 结论

牛肉宰后贮藏过程中,牛肉颜色发生了显著变化。肌红蛋白基因表达量在贮藏0~4 d呈略微上升趋势,4~8 d呈下降趋势,整体呈下降趋势。采用4D-LFQ蛋白组学技术研究了秦川牛肉在宰后贮藏中的差异蛋白质表达量变化,以1.2倍的差异倍数,鉴定出120种差异蛋白。分析了与肌红蛋白及其衍生物相关的14种差异蛋白质,这些蛋白质按其功能可分为代谢酶、氧化还原酶、过氧化物酶、伴侣蛋白4类,通过参与糖酵解途径、能量代谢、脂质氧化、结构裂体、蛋白裂解等途径,影响肌红蛋白的新生与消亡及其衍生物转化。通过拉曼光谱法测定3种肌红蛋白衍生物的相对含量,随着贮藏时间的延长,使肉类呈现鲜红色的OxyMb相对含量明显降低,MetMb、DeoMb相对含量缓慢上升,这与蛋白质组学分析吻合。随着贮藏时间的延长,肉的 L^* 值增加, b^* 值增加, a^* 值下降,表现为肉色发生褐变。研究结果揭示了差异蛋白和肌红蛋白含量及衍生物占比间存在潜在的相关性,为理解肉类变色的复杂生化反应、预测和控制冷却秦川牛肉贮藏过程中肉色变化提供理论参考。

参考文献:

- [1] 吴爽,罗欣,毛衍伟,等.线粒体对肉色及其稳定性影响的研究进展[J].食品科学,2018,39(15):247-253. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201815036.
- [2] 肖蕾,蓝蔚青,孙晓红,等.流通过程对大目金枪鱼肉质稳定性与氧化性能的影响[J].中国食品学报,2020,20(1):212-221. DOI:10.16429/j.1009-7848.2020.01.028.

- [3] 张同刚, 李亚蕾, 罗瑞明, 等. 冷鲜牛肉贮藏过程中线粒体变化与肌红蛋白氧化状态的相关性[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 35-40. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180409-103.
- [4] WU Shuang, LUO Xin, YANG Xiaoyin, et al. Understanding the development of color and color stability of dark cutting beef based on mitochondrial proteomics[J]. Meat Science, 2020, 163: 18046. DOI:10.1016/j.meatsci.2020.108046.
- [5] 智研咨询公司. 2017-2023年中国肉牛养殖市场深度研究与投资战略报告[R/OL]. (2017-07)[2020-03]. <http://www.ibaogao.com/baogao/0G22150362017.html>
- [6] 张同刚, 罗瑞明, 李亚蕾, 等. 基于拉曼光谱法测定冷鲜牛肉中肌红蛋白相对含量[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 210-214. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201802033.
- [7] HERAWATI M, WARDAYA, MULYAWAN W, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and myoglobin in rat heart as adaptive response to intermittent hypobaric hypoxia exposure[J]. HAYATI Journal of Biosciences, 2017, 24(3): 131-135. DOI:10.1016/j.hjb.2017.08.010.
- [8] YIN Shuang, FAUSTMAN C, TATIYABORWORNTHAM N, et al. Species-specific myoglobin oxidation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(22): 12198-12203. DOI:10.1021/jf202844t.
- [9] 黄宇菲. 烯醇化酶在模式生物中的功能研究进展[J]. 冶金与材料, 2019, 39(4): 15-17. DOI:10.3969/j.issn.1674-5183.2019.04.007.
- [10] 刘秋凤. 肌肉糖酵解对北京黑猪肉品质性状的影响及其差异蛋白研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019: 12-14.
- [11] 罗培, 赵伟杰, 王丽娜, 等. 肌红蛋白和线粒体互作研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(5): 6-11. DOI:10.19556/j.0258-7033.20190929-04.
- [12] RANDEZ-GILL F, SÁNCHEZ-ADRIÁ I E, ESTRUCH F, et al. The formation of hybrid complexes between isoenzymes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates its aggregation state, the glycolytic activity and sphingolipid status in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(2): 562-571. DOI:10.1111/1751-7915.13513.
- [13] 吴永红. GAPDH作为原核及真核生物通用型内标蛋白的研究及相关生物技术研发[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2013: 29-31.
- [14] 辛建增. 糖酵解脱氢酶对宰后羊肉色泽稳定性的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017: 10-12.
- [15] 王璐. 阿尔茨海默病突触线粒体质量控制机制的研究[D]. 济南: 山东大学, 2016: 27-28.
- [16] 赵裕君. SUCLA2在 β 毒性神经元中表达量的变化及其对线粒体功能影响的机制研究[D]. 济南: 山东大学医学院, 2019: 54-59.
- [17] 常婷. 人腺苷酸激酶催化ADP生成ATP和AMP的结构基础研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2018: 6-8.
- [18] 崔大超. 底物耦合的腺苷酸激酶功能运动与解折叠动力学[D]. 南京: 南京大学, 2015: 31-38.
- [19] 孔剑阳, 李文飞, 王炜. 腺苷酸激酶催化产物释放过程中的水化动力学研究[J]. 南京大学学报(自然科学版), 2020, 56(2): 244-252. DOI:10.13232/j.cnki.jnju.2020.02.010.
- [20] ALEXANDRA T, AXEL M, STEFAN S, et al. Kinetic coupling of the respiratory chain with ATP synthase, but not proton gradients, drives ATP production in cristae membranes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(5): 2412-2421. DOI:10.1073/pnas.1917968117.
- [21] SALADI S, BOOS F, POGLITSCH M, et al. The NADH dehydrogenase Nde1 executes cell death after integrating signals from metabolism and proteostasis on the mitochondrial surface[J]. Molecular Cell, 2020, 77(1): 1-14. DOI:10.1016/j.molcel.2019.09.027.
- [22] BEKHIT A E D, FAUSTMAN C. Metmyoglobin reducing activity[J]. Meat Science, 2005, 71(3): 407-439. DOI:10.1016/j.meatsci.2005.04.032.
- [23] ZOTTE A D, RÉMIGNON H, OUHAYOUN J. Effect of feed rationing during post-weaning growth on meat quality, muscle energy metabolism and fibre properties of *Biceps femoris* muscle in the rabbit[J]. Meat Science, 2005, 70(2): 301-306. DOI:10.1016/j.meatsci.2005.01.016.
- [24] COLLINS S S, KEETON J T, SMITH S B. Lactate dehydrogenase enzyme activity in raw, cured, and heated porcine muscle[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(7): 1294-1297. DOI:10.1021/jf00007a020.
- [25] 李拥军. 山羊早期胚胎发育基因表达的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005: 58-60.
- [26] 苏忆非. 小鼠受精卵模拟微重力差异基因的验证及Ndufa4对其体外发育的影响[D]. 广州: 华南农业大学, 2016: 34-36.
- [27] 郭威. 牛肉冷贮贮藏期间肉色褐变相关生物标志物的定量蛋白质组学方法研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018: 38-44.
- [28] MERCIER Y, GATELLIER P, RENERRE M. Lipid and protein oxidation *in vitro*, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet[J]. Meat Science, 2004, 66(2): 467-473. DOI:10.1016/S0309-1740(03)00135-9.
- [29] 何静. 以Hsp90/Cdc37复合物为靶点的Hsp90抑制剂的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016: 3-14.
- [30] JOSEPH P, SUMAN S P, RENTFROW G, et al. Proteomics of muscle-specific beef color stability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(12): 3196-3203. DOI:10.1021/jf204188v.
- [31] 李蒙, 李铮, 李欣, 等. 磷酸化水平对肌红蛋白稳定性的影响[J]. 中国农业科学, 2017, 50(22): 4382-4388. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2017.22.014.
- [32] 郑妮, 胡生海, 何元翔, 等. 牛肉肌红蛋白提纯及其协同脂质氧化效应分析[J]. 食品科技, 2019, 44(12): 111-116. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2019.12.020.
- [33] WANG Zhaoming, HE Zhifei, GAN Xiao, et al. Interrelationship among ferrous myoglobin, lipid and protein oxidations in rabbit meat during refrigerated and superchilled storage[J]. Meat Science, 2018, 146: 131-139. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.08.006.
- [34] 张同刚, 罗瑞明, 李亚蕾, 等. 拉曼光谱分析牛肉贮藏过程中肌红蛋白结构的变化[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 15-19. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180408-083.
- [35] WU W, GAO X G, DAI Y, et al. Post-mortem changes in sarcoplasmic proteome and its relationship to meat color traits in *M. semitendinosus* of Chinese Luxi yellow cattle[J]. Food Research International, 2015, 72: 98-105. DOI:10.1016/j.foodres.2015.03.030.
- [36] MONDAL S, GHOSH S. Effect of curcumin on the binding of cationic, anionic and nonionic surfactants with myoglobin[J]. Journal of Molecular Structure, 2017, 1134: 292-297. DOI:10.1016/j.molstruc.2016.12.084.