

应用于肉品嫩化的组织蛋白酶的研究进展

陈琳, 徐幸莲, 周光宏*

(南京农业大学 教育部肉品加工与质量控制重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 大量研究表明, 成熟嫩化过程是肌肉内源蛋白水解酶的作用所致。组织蛋白酶是其中一个重要的内源蛋白, 可以水解肌原纤维。本文简要介绍了溶酶体中的组织蛋白酶, 以及其稳定性和在骨骼肌中的表达特性。并且就组织蛋白酶的分类、影响其活性的因素、在肉嫩化中的作用、分离提纯、活性测定方法及应用前景等作了介绍。

关键词: 嫩化; 组织蛋白酶; 溶酶体

Research Progress on Lysosomal Cathepsins Applied in Meat Tenderization

CHEN Lin, XU Xing-lian, ZHOU Guang-hong*

(Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Experimental data extensively suggest that the proteolysis of endogenous proteases is the key reason for meat tenderization. Cathepsin is one of these proteases, and it has the proteolytic function. This article briefly described the stability of lysosomal cathepsins and their expression in myofibrillar. Also, the classification of cathepsins, influence factors on their activities, their contribution to meat tenderization, their isolation and purification, methods for assaying activities as well as their application prospect were discussed in this article.

Key words: tenderization; cathepsin; lysosome

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0271-04

肉类食品是人类获得动物性蛋白质的主要来源, 在人们的饮食结构中, 肉类食品占有相当大的比例, 是人体所需营养的重要来源。可以说肉类食品是人类不可缺少的食品。肉的嫩度是消费者最重视的食用品质之一, 它是反映肉的质地的指标, 嫩度决定了肉在食用时口感的“老”和“嫩”。因此, 研究肉的嫩化机制和促进嫩化的方式方法对提高肉的食用品质具有重要的意义。

嫩度是决定消费者购买力的一个重要因素, 肉嫩度的提高可以通过“成熟过程”来完成的, 一般是通过在冰柜中冷藏胴体的方法来实现成熟过程的。例如, 牛肉理想成熟时间一般是8~11d。成熟过程一般认为是肌肉内源蛋白质水解酶的作用所致, 并且肉的嫩化是一个复杂的物理化学(包括pH值和离子强度)和生物化学(细胞内蛋白水解酶)过程, 在这个过程中, 肌原纤维结构会变软, 细胞骨架会消失。但是, 准确的机制还不太清楚。

细胞骨架蛋白的水解被认为是在肉的成熟嫩化过程

贡献巨大。有三个主要的蛋白水解系统起作用, 溶酶体蛋白酶(组织蛋白酶), 钙激活酶和蛋白酶体。钙激活酶在肉嫩化中的作用已被广泛的报道。虽然, 组织蛋白酶的作用在宰后的前几天似乎是有限的, 但在成熟后期作用巨大。特别是在胴体pH值下降后, 钙激活酶的活性就基本检测不到了, 然而组织蛋白酶却一直有活性。蛋白酶体还没有广泛的研究, 并且许多研究有相互矛盾的地方。

由于从结构的变化判断, 没有一个单独的蛋白水解系统可以解释宰后肌肉的蛋白水解过程, 所以Ouali^[1]建议考虑钙激活酶和组织蛋白酶, 蛋白酶体的协同增效作用。Robert等^[2]提出钙激活酶降解后, 蛋白酶体开始发挥作用。而Calkins等^[3]提出在宰后早期(24h)组织蛋白酶与鱼肉成熟的一个相关的作用。还指出蛋白酶体在高pH值的肉、宰后缓慢氧化的肉或I型肌肉的嫩化中, 起着重要的作用。

收稿日期: 2007-11-17

基金项目: 国家“973”计划项目(2006CB708212)

作者简介: 陈琳(1983-), 女, 博士研究生, 主要从事畜产品加工与质量控制研究。E-mail: melodychenlin@126.com

* 通讯作者: 周光宏(1960-), 男, 教授, 博士, 主要从事肉加工质量控制、维生素吸收代谢机制的研究。

E-mail: ghzhou@njau.edu.cn

1 溶酶体组织蛋白酶

溶酶体存在于肌细胞的肌浆中, pH 值在被宰杀的牲畜体内并不是固定不变的, 而是在宰杀后, 由于糖原的分解作用以及肌肉内产生乳酸, pH 值会随之下落。当被宰杀牲畜体内 pH 值降至 5.5 时, 不仅能减缓钙激活因子的活性, 而且随着乳酸的增多, 还能引起细胞内的另一种极为重要的变化, 即破坏溶酶体。这一变化会导致溶酶体释放出相当数量的酶, 其中也有组织蛋白酶。

溶酶体组织蛋白酶的作用是降解细胞内的蛋白质, 这类降解对于活组织有着重要的生理和病理意义, 对畜禽宰后肌肉的成熟嫩化也起着至关重要的作用。已知的 13 种溶酶体组织蛋白酶中, 8 种已证实从骨骼肌中分离到, 它们是 A、B₁、B₂(溶酶体羧肽酶 B)、C、D、E、H 和 L。而组织蛋白酶 B、D、H 及 L 是引起宰后肌肉降解的主要酶类。

2 组织蛋白酶在骨骼肌中的表达特性

溶酶体组织蛋白酶 B、H、L 和 D 虽然可以在各处表达, 但仍然表现出组织特异性分类。组织蛋白酶在肾、脾、肝、胎盘等组织中的表达水平很高, 这些组织中都发现了高速率的组织蛋白酶周转, 然而, 组织蛋白酶在骨骼肌中却表现出低浓度的缓慢周转。

虽然组织蛋白酶在成人骨骼肌中的表达量很小, 但是许多研究表明组织蛋白酶存在于这个组织中。肌肉组织蛋白酶按各个种类分类, 包括人类、老鼠、小鼠、牛、猪、鸡、鱼, 不同的肌肉中得到相似的酶特性, 其不依赖于它们新陈代谢和收缩的类型^[4]。

3 组织蛋白酶水解肌原纤维

组织蛋白酶对肌肉中重要蛋白的降解部位包括: (1) 肌钙蛋白 T, I(pH < 6) 和 C 蛋白; (2) 肌球蛋白(重、轻链)、肌动蛋白、原肌球蛋白、 α -肌动蛋白素、伴肌动蛋白、伴肌球蛋白; (3) 胶原蛋白非螺旋末端肽之间的交联键; (4) 基质黏多糖。

在体外, 溶酶体的肽链内切酶对纯的肌原纤维蛋白都有降解作用。不同的组织蛋白酶具有不同的水解特性。组织蛋白酶 H 具有内切酶和外切酶特性, 分子量为 26~28kD。组织蛋白酶 H 主要降解肌钙蛋白 T。组织蛋白酶 B 水解肌球蛋白重链, 肌钙蛋白 T, 并且会缓慢降解肌钙蛋白 I 和原肌球蛋白。组织蛋白酶 L 除了肌钙蛋白 C 和原肌球蛋白以外, 降解大部分的肌原纤维蛋白。组织蛋白酶 D 是唯一的天门冬氨酸蛋白酶, 其分子量在 43~53kD, 可以降解肌球蛋白、肌动蛋白、巨肌(titin)蛋白。

Calkins 等^[3]报道了组织蛋白酶 B 和 H 在牛肉成熟的 1~14d 和 3~6d 内, 它们对剪切力降低的贡献率分别为

35% 和 58%。因为在体外, 组织蛋白酶的高浓度和多样性无法模拟, 可以想象组织蛋白酶在体内破裂的潜能将更加巨大。Kubo 等^[5]报道, 组织蛋白酶 D 在肉的嫩化中具有很重要的作用, 并且在成熟过程中产生与风味有关的化合物。因为在成熟过程中, 肌肉的 pH 值变化有一段与组织蛋白酶 D 最适 pH 值相同的时期, 并且在这段时间内, 组织蛋白酶 D 的特异性底物不存在。

研究组织蛋白酶的水解作用一般通过添加抑制剂 E64(半胱氨酸酶的抑制剂)、亮肽素(半胱氨酸酶和丝氨酸酶的抑制剂)和抑肽素 A(天冬氨酸酶的抑制剂)来实现。但它们不太具有膜渗透性, 并且在体内抑制组织蛋白酶也不稳定^[6]。有研究发现, 注射组织蛋白酶抑制剂到肌肉, 组织蛋白酶可以用来降低 3-甲基-组氨酸的释放(一个肌原纤维水解的指标)。事实上, 完全和有选择性的抑制溶酶体的蛋白水解通常是很难实现的, 甚至在培养的细胞中也很难实现。

4 组织蛋白酶的稳定性

4.1 组织蛋白酶在肉制品中的稳定性

Thomas 等^[7]报道, 鸵鸟肉的成熟过程中, 组织蛋白酶 D 在整个储存 12d 的过程中, 4℃下始终保持稳定的活性。组织蛋白酶 B、L 和 H 的活性在宰后的几个小时内达到最小值, 而后升高, 经过 12d 的储存也保持稳定。

在干腌火腿的过程中, 虽然中性蛋白钙激活酶在成熟早期中起主要的作用, 但在腌制的后期实际上并没有作用。钙激活酶和组织蛋白酶这两个蛋白酶体系, 钙激活酶非常地不稳定, 并且它们的活性在加盐处理后就检测不到了, 然而组织蛋白酶一直有活性, 可以保持到腌制处理的最后^[8]。火腿制作过程中, 蛋白质水解应该是组织蛋白酶 B、D、H 及 L 作用的结果。因为在整个加工过程, 甚至在 15 个月后, 它们仍有活性。而且在火腿成熟后的几个月内, 非蛋白氮含量逐渐上升也表明这时仍有蛋白水解现象发生。Garcia-Garrido 等^[9]另有报道, 组织蛋白酶 N、B+L、H 和 D 在腌制过程中可能完全或大部分起到水解蛋白的作用。因为他们的活性在整个过程中都能检测到, 并且在最后也能达到最初值的 5%~15%。

4.2 影响组织蛋白酶稳定性的因素

目前的研究表明, 组织蛋白酶 B 的活性在火腿处理中是最稳定的, 可能是因为猪的 Cystatins(半胱氨酸蛋白酶抑制剂)中对组织蛋白酶 B 抑制的活动少^[10]。还有研究表明, 肌肉 Cystatins 对组织蛋白酶 B 的亲和力比对组织蛋白酶 L 的低。20% 盐的存在可以使组织蛋白酶 B+L 的活性增加, 但增加更多的盐和葡萄糖却不会再影响组织蛋白酶 B+L 的活性。

Melendo 等^[11]研究了组织蛋白酶 B、H 和 L 在腌制添加剂(NaCl、硝酸盐、抗坏血酸、葡萄糖)和加工指标(pH 值, 温度和蒸煮温度)中的情况。结果表明, 在

20~60g/L 的范围内, NaCl 抑制了组织蛋白酶 B+L 和 H 的活性。当抗坏血酸的活性高达 8g/L 时, 这三种半胱氨酸蛋白酶的活性都会受到抑制。组织蛋白酶 B 除了受葡萄糖的抑制外, 硝酸盐和葡萄糖对组织蛋白酶 B、B+L 和 H 的影响都非常小。

在任何的储存条件下, 组织蛋白酶 D 的活性损失都比组织蛋白酶 B 和 B+L 的低。用山梨糖醇或者甘油作为防冻剂, 在任何冷冻温度下, 包括 220℃, 都可以提高组织蛋白酶活性和肌原纤维水解能力^[11]。

5 影响组织蛋白酶活性的因素

5.1 温度

组织蛋白酶 B 和 D 分别在 65℃ 和 69℃ 发挥其活性, 所以其在蒸煮肉的处理过程中和肉制品加工中起着重要的降解作用。组织蛋白酶 B, B+L 和 H 的最适活性温度为 40~45℃ 及 50℃, 并且在温度很低时, 依然在干腌过程中有着很强的活性。已有报道, 来源(牛肉、鸡肉、鸵鸟肉、猪肉等)不同的组织蛋白酶 D 在温度 33~60℃ 时, 活性会提高^[12]。并且在接近 70℃ 时, 也可以保持较高的活性^[13-14]。

5.2 pH 值

组织蛋白酶是酸性水解酶, 低的 pH 值是多种组织蛋白酶的适宜环境。每种组织蛋白酶都有其适宜的 pH 值范围, 组织蛋白酶 B 为 3.0~6.0, 组织蛋白酶 D 为 pH2.5~4.5, 组织蛋白酶 H 为 pH5.0~7.0, 组织蛋白酶 L 为 3.0~6.0, 组织蛋白酶 N 为 pH3.0~6.0 等。一般组织蛋白酶的 pH 值经常和温度在一起综合考虑。

5.3 高压

高压可以释放溶酶体中的酶, 已成为一个用于肉嫩化过程的新技术, 然而, 高压处理肉嫩化或肉成熟的结果还不是很清楚。Elgasim 等^[15]报道压力或加热的运用会引起肉的韧度降低, 但是这些处理会使肉出现变色或污点。高压作用可促使溶酶体膜的破裂和组织蛋白酶的释放。因此, 高压对肉嫩化有积极的影响。在高达 400MPa 的高压(低温, 2~10℃)影响下, 肌肉中组织蛋白酶 D 的活性有一个巨大的提升^[16-17]。高压下, 在宽阔的温度范围(33~70℃)内, 组织蛋白酶 D 的活性会增加, 并且这与压力辅助凝胶化的观点相一致。Jung^[18]等发现 520MPa 高压处理 260s 可以使组织蛋白酶 D 和磷酸酶的活性显著($p < 0.05$)的提高。

尽管高压处理显著提高了宰后 2d 肌肉中溶酶体酶的活性, 这种处理却没有降低肉的韧度或者减少储存的时间。高压作用、肉中与肉嫩度有关的酶的活性和它们之间的关系应该再仔细研究。酶活性的增加和肉结构的改变, 可能是由于高压引起物理化学环境的变化。并且, 修饰作用使酶在这样的环境下改变。另外一种可能性是超微结构的改变, 从而改变了组织蛋白酶与底物

之间的反应。

5.4 电刺激

电刺激可以加速胴体的糖酵解反应, 使动物胴体在较高体温下获得较低 pH 值。并且高温和低 pH 值有利于溶酶体膜的破裂, 促进组织蛋白酶的释放与活性发挥。电刺激主要增加了肌原纤维片断中组织蛋白酶 B+L 的活性, 其活性大约增加了一倍。但是, 除肌原纤维外的其他片段的蛋白水解活性并没有改变。电刺激在尸僵时引起肌肉收缩和促进肌肉新陈代谢, 以及 pH 值的降低。电刺激还可以使冷却减少, 并且降低了肌原纤维的机械破坏。这样提高了蛋白水解, 研究表明其有利于提高嫩度^[19]。

5.5 抑制剂

传统的研究酶的方法都是应用一些特殊的抑制剂研究酶的活性和作用机制。E64(半胱氨酸酶的抑制剂)、亮肽素(半胱氨酸酶和丝氨酸酶的抑制剂)和抑肽素 A(天冬氨酸酶的抑制剂)经常被应用, 但它们不太具有膜渗透性, 并且在体内抑制组织蛋白酶也不稳定。在体外研究中, 有报道, 肌肉 Cystatins(半胱氨酸蛋白酶抑制剂)对组织蛋白酶 B 的亲合力比对组织蛋白酶 L 的低^[10]。抑肽素是一种特殊并且非常有用的组织蛋白酶 D 的抑制剂, 用来研究内源蛋白在肉成熟中的作用、热影响肉嫩化的作用、肌原纤维蛋白的热扫描流变学特性以及热和压力影响使肉的变化。

6 组织蛋白酶分离与活性测定

6.1 组织蛋白酶分离

牛的脾脏是许多组织蛋白酶的很好的来源, 主要有 B、L、D、H、N 和 S。牛的脾脏提取物表现出组织蛋白酶的活性, 特别是组织蛋白酶 B、B+L、D、G 和 H 的活性很高。它们与肽链端解酶相同, 具有剧烈降解肌原纤维蛋白和胶原质的能力, 水解蛋白活性伴随着脂肪酶和酯酶的活性, 和一个低的过氧化物酶的活性。由此可以得出结论, 牛的脾脏溶酶体的富集提取可能是一个非常有益的肌肉类食品嫩化及成熟的方法, 例如, 鸡肉, 鱼肉及其产品。并且有研究证明, 被溶酶体提取物处理过的肌肉的质地与那些自然成熟过的肉相似。而酶的富集提取物在工业应用时, 最主要的问题是在储存过程中酶活损失的问题^[11]。

通常为除去 Cystatins, 采取亲和和层析法提取组织蛋白酶, 即样品(5g)→匀浆(加 7 倍体积缓冲液, 缓冲液组成: 50mmol/L NaAc、100 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、0.2% Triton X-100(V/V), 用 HAc 调 pH 至 5.0)→存放 1h 离心(32000 × g、30min)→过滤→装柱(S-carboxymethylated-papain-sepharose 亲和柱)→4℃ 反应 2h →用缓冲溶液洗脱→收集组分^[20]。

6.2 组织蛋白酶活性测定

组织蛋白酶 B、B+L、H 的活性用荧光法测定, 组织蛋白酶 B 及 B+L 分别以 N-苄酯基-L-精氨酸-7-酰胺基-4-甲基香豆素(N-CBZ-L-arginyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin, 简称为 Z-Arg-Arg-NHMec)和 N-苄酯基-苯丙氨酸-精氨酸-7-酰胺基-4-甲基香豆素(N-CBZ-L-phenylalanyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin, 简称为 Z-Phe-Arg-NHMec)为底物, 在 37℃ 及 pH6.0 进行反应, 活性单位为被释放的香豆素 nmol/min · g 肉; 组织蛋白酶 H 的活性在 pH6.8, 37℃ 反应, 以 N-苄酯基-L-精氨酸-7-酰胺基-4-甲基香豆素为底物测定^[21]。组织蛋白酶 D 根据 Rico 等^[22]的方法进行测定, pH3.7, 45℃ 下以含有 0.60% 酸变性的牛血红蛋白作为底物, 并与含有 0.025mmol/L 异戊酰抑胃肽素(pepstatin A)的对照进行比较。1U 酶活性定义为在 pH3.7 和温度 45℃ 下保育 1h 吸光度增加 0.001 单位所需要酶的浓度。

7 展望

嫩度是决定肉品质的重要指标。同时也是肉最重要的感观特征。肉在成熟排酸过程中, 嫩度会逐渐增加。这主要与肉中内源蛋白酶有关。近几十年来, 对肉嫩化有关的内源蛋白酶的研究一直是肉品学科研究的热点之一。目前所发现与肉嫩度有密切关系的内源酶有三类: 钙激活酶、组织蛋白酶和蛋白酶体。由于从结构的变化判断, 没有一个单独的蛋白水解系统可以解释宰后肌肉的蛋白水解过程, 所以有学者建议考虑这三种蛋白水解酶体系的协同增效作用。另外, 在肉中还发现一些其它蛋白酶, 由于它们在肉嫩化中的作用甚微, 未能得到重视。对肉中内源蛋白酶进行更深入地研究, 形成更系统更完善的理论, 有着广阔的应用前景: 可以用于宰前肉嫩度的预测和肉类分级; 可以用于宰后肉品加工的工艺控制; 可以指导利用基因重组技术对畜禽进行品种改良等。所以, 内源蛋白酶理论体系的形成与发展对肉品加工业有着重要的意义。

然而, 对钙激活酶类的研究国内外已有许多。国外对组织蛋白酶的研究在上世纪 70、80 年代很多, 但是自从钙激活酶理论发现后, 又提出了单纯的钙离子直接诱导肌原纤维的降解的理论, 于是学者们就转向钙激活酶理论与钙离子理论的争论。然而, 组织蛋白酶对肉的嫩化也具有重要的作用。特别是在胴体 pH 值下降后, 钙激活酶的活性就基本检测不到了, 然而组织蛋白酶却一直有活性。所以, 组织蛋白酶的作用在这近几年又得到了重视。由于组织蛋白酶包含在溶酶体内, 所以溶酶体膜破裂后, 它们才能释放出来。目前主要的争论就在于它们是否能从溶酶体中释放出来, 从而进入肌原纤维结构中, 发挥水解作用。因此, 组织蛋白酶体系在肉品的成熟嫩化中具有更广阔的研究前景, 对肉品的加工工艺也起着重要的意义。

参考文献:

- [1] OUALI A. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development[J]. Biochimie, 1992, 74: 251-265.
- [2] ROBERT N, BROAND M, TAYLOR R, et al. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle[J]. Meat Science, 1999, 51: 149-153.
- [3] CALKINS C R, SEIDMAN S C. Relationship among calcium-dependent protease, cathepsin B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging[J]. Journal of Animal Science, 1988, 66: 1186-1193.
- [4] BECHET D, TASSA A, TAILLANDIER D, et al. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37: 2098-2114.
- [5] KUBO T, GEREIT B, HAN G O, et al. Changes in immunoelectron microscopic localization of cathepsin D in muscle induced by conditioning or high-pressure treatment[J]. Meat Science, 2002, 61: 415-418.
- [6] WILCOX D, MASON R W. Inhibition of cysteine proteinases in lysosomes and whole cells[J]. Biochemical Journal, 1992, 285: 495-502.
- [7] THOMAS A R, GONDOZA H, HOFFMAN L C, et al. The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderization [J]. Meat Science, 2004, 67: 113-120.
- [8] GIL M, GUERRERO L, SARRAGA C. The effect of meat quality, salt and ageing time on biochemical parameters of dry-cured *longissimus dorsi* muscle[J]. Meat Science, 1999, 51: 329-337.
- [9] GARCÍA-GARRIDO J A, QUILES-ZAFRA R, TAPIADOR J, et al. Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture[J]. Meat Science, 2000, 56: 1-6.
- [10] GIL M, SARRAGA C. Isolation and characteristics of a porcine muscle cysteine proteinase inhibitory fraction[J]. Food Biotechnol, 1997, 11(1): 59-71.
- [11] MELENDO J A, BELTRAN J A, RONCALES P. Preservation of the proteolytic activity of a bovine spleen lysosomal-enriched extract using various freezing conditions[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28: 453-459.
- [12] PRZYSIEZNA E, SKRABBA-BLOTNICKA T. Effect of some factors used to the chicken meat preservation and processing on the protease activity[J]. Nahrung, 1996, 40(4): 200-205.
- [13] SPANIER A M, MCMILLIN K W, MILLER J A. Enzyme activity levels in beef: Effect on postmortem aging and end-point cooking temperature[J]. Journal of Food Science, 1990, 55(5): 318-322; 326.
- [14] TOLDRA F, RICO E, FLORES J. Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems[J]. Biochimie, 1992, 74(3): 291-296.
- [15] ELGASIM E A, KENNICK W H. Effect of high pressure on meat microstructure[J]. Food Microstructure, 1982(1): 75-82.
- [16] HOMMA N, IKEUCHI Y, SSZUKI A. Effects of high pressure treatment on the proteolytic enzymes in meat[J]. Meat Science, 1994, 38(2): 219-228.
- [17] JUNG S, LAMBALLERIE-ANTON M, TAYLOR R G, et al. High-pressure effects on lysosome integrity and lysosomal enzyme activity in bovine muscle[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48 (6): 2467-2471.
- [18] JUNG S, GHOU M, DE LAMBALLERIE-ANTON M. Changes in lysosomal enzyme activities and shear values of high pressure treated meat during ageing[J]. Meat Science, 2000, 56: 239-246.
- [19] MARIPO H, ERIBJERG P, ANDESSON M, et al. Electrical stimulation of pigs-effect on pH fall, meat quality and cathepsin B+L activity[J]. Meat Science, 1999, 52(2): 179-187.
- [20] 黄明, 罗欣. 内源蛋白酶在肉嫩化中的作用[J]. 肉类研究, 1999(2): 9-11; 14.
- [21] GARCIA-CARRIDO J A, QUILES-ZAFRA R, TAPIADOR J, et al. Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture[J]. Meat Science, 2000, 56(1): 1-6.
- [22] RICO E, TOLDRA F, FLORES J. Assay of cathepsin D activity in fresh pork muscle and dry-cured ham[J]. Meat Science, 1991, 29: 287-293.