

丙二醛对牛肉线粒体高铁肌红蛋白还原能力的影响*

陈 骋¹ 余群力¹ 韩 玲¹ 韩广星² 于春起³

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 山东绿润食品有限公司, 临沂 276000;
3. 河北福成五丰食品股份有限公司, 三河 065201)

摘要: 研究了体外孵化条件下脂质氧化产物丙二醛对牛肉线粒体膜通透性、微观结构及其电子传递链调控的高铁肌红蛋白还原能力和 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶活力的影响。结果表明:在 pH 值 5.6(模拟贮藏条件)和 pH 值 7.4(模拟生理条件)条件下,线粒体与丙二醛孵化后膜通透性、孵化液体荧光强度均比对照组显著增大($P < 0.05$),线粒体微观结构出现肿胀变形、嵴消失、空泡状等现象。当 pH 值为 7.4 时,膜通透性、荧光强度显著高于前者($P < 0.05$),说明在生理 pH 值条件下丙二醛更易与线粒体膜作用进而对其结构造成破坏。琥珀酸盐能够促进牛肉线粒体电子传递链调控的高铁肌红蛋白还原过程,在 pH 值 5.6 和 pH 值 7.4 条件下添加琥珀酸盐孵化 9 h 后,高铁肌红蛋白相对含量分别减少了 21.70% 和 12.87% ($P < 0.05$)。但是在反应体系中加入丙二醛孵化 9 h 后,高铁肌红蛋白的还原量分别比未添加时降低了 15.68% 和 3.83% ($P < 0.05$)。丙二醛同样能够抑制牛肉线粒体 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶的活力,其活力在上述 pH 值条件下分别降低了 48.97% 和 47.80% ($P < 0.05$)。综上可知,丙二醛能破坏牛肉线粒体结构,抑制线粒体还原高铁肌红蛋白的能力,对新鲜牛肉保持其色泽稳定性是不利的。因此,降低牛肉贮藏过程中脂质氧化程度、维持线粒体正常的呼吸作用,对于保护牛肉色泽稳定性具有重要意义。

关键词: 牛肉 丙二醛 线粒体 高铁肌红蛋白 还原能力

中图分类号: TS251.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)12-0253-07

Effects of Malondialdehyde on Metmyoglobin Reduction Ability of Bovine Muscle Mitochondria

Chen Cheng¹ Yu Qunli¹ Han Ling¹ Han Guangxing² Yu Chunqi³

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China
2. Shandong Lorain Food Co., Ltd., Linyi 276000, China 3. Hebei Fucheng Wufeng Food Co., Ltd., Sanhe 065201, China)

Abstract: The effects of malondialdehyde on bovine mitochondrial microstructure and metmyoglobin reduction ability were evaluated by measuring membrane permeability, malondialdehyde binding capacity, microstructure, electron transport chain-mediated metmyoglobin reduction and NADH-dependent metmyoglobin reductase activity. Compared with control groups, mitochondria incubated with malondialdehyde were increased significantly ($P < 0.05$) from membrane permeability and fluorescence intensity. As a result, mitochondria were swollen, mitochondrial cristae were partially disappeared and some of which were slightly vacuolated. Mitochondria incubated with malondialdehyde at pH value of 7.4 (storage condition) had a greater membrane permeability and higher fluorescence intensity ($P < 0.05$) than those of at pH value of 5.6 (physiological condition), which indicated that malondialdehyde reacted with mitochondrial membrane more easily under physiological condition, resulting in more serious injury

收稿日期: 2015-05-17 修回日期: 2015-06-25

* 国家自然科学基金资助项目(31260380)、国家现代农业产业(肉牛牦牛)技术体系资助项目(CARS-38)和甘肃省科技重大专项计划资助项目(143NKDP020)

作者简介: 陈骋, 博士生, 主要从事畜产品加工研究, E-mail: 329211040@qq.com

通讯作者: 余群力, 教授, 博士生导师, 主要从事畜产品加工研究, E-mail: yuqunlihl@163.com

to membrane. Succinate promoted the electron transport chain-mediated metmyoglobin reduction, the relative metmyoglobin contents were decreased by 21.70% and 12.87% ($P < 0.05$) at pH values of 5.6 and 7.4 compared with control groups (without succinate), respectively. Nevertheless, mitochondrial electron transport chain-mediated metmyoglobin reduction was inhibited when incubated with malondialdehyde, the reduction amounts of metmyoglobin were decreased by 15.68% and 3.83% ($P < 0.05$) at pH values of 5.6 and 7.4 compared with control groups (without malondialdehyde), respectively. In addition, NADH-dependent metmyoglobin reductase activity was also inhibited by malondialdehyde, which was decreased by 48.97% and 47.80% ($P < 0.05$) respectively when incubated with malondialdehyde at pH values of 5.6 and 7.4. In conclusion, malondialdehyde could injure the microstructure of mitochondria and inhibit the mitochondria mediated metmyoglobin reduction, which was disadvantageous to color stability of fresh beef. Therefore, it is meaningful to reduce lipid oxidation and maintain mitochondrial respiratory function for protecting color stability during storage.

Key words: Beef Malondialdehyde Mitochondria Metmyoglobin Reduction ability

引言

色泽是牛肉重要的感官指标之一,宰后贮藏过程中肉色由肌红蛋白的氧化状态决定,随着肌红蛋白的氧化,牛肉中高铁肌红蛋白含量逐渐升高,肉色便随之发生褐变^[1-2]。鲜牛肉中的线粒体在一定程度上发挥着稳定肉色的作用,该作用主要通过线粒体呼吸链电子传递和酶促还原反应这2条途径来实现^[3]。具体来说,一是在电子呼吸链中通过细胞色素c从合物Ⅲ和Ⅳ之间将电子转移到高铁肌红蛋白使其还原^[4];二是线粒体外膜中由细胞色素b5还原酶、细胞色素b5和NADH组成的高铁肌红蛋白酶促还原反应^[5]。因此,影响线粒体功能的因素也可能影响牛肉色泽的稳定性。

脂质氧化是影响线粒体功能的重要原因,线粒体中约有50%的脂肪酸是不饱和的,这些氧化可以形成各种醛类化合物,4-羟基壬烯醛和丙二醛是最具代表性的2种脂质氧化产物^[6]。许多研究已经证实4-羟基壬烯醛能够影响线粒体的生理功能^[7-9]。另一种脂质氧化的代表产物丙二醛也能与细胞中80%的蛋白质结合造成其结构改变,同时也会与细胞膜结合造成其通透性改变^[7]。但是,丙二醛对线粒体及调控的高铁肌红蛋白还原能力的影响目前尚未证实。

体外孵化研究可以消除肌肉组织中其他因素对研究结果的干扰,同时也更易于控制外界条件,是目前探究生化因子对肌肉特性影响的重要研究方法。本文采用体外孵化方法,在体外模拟牛肉贮藏和生理pH值条件下脂质氧化产物丙二醛对牛肉线粒体膜通透性、微观结构及其调控的高铁肌红蛋白还原能力的影响,以期延缓肉色劣变、延长牛肉货架期等相关技术的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料:西门塔尔杂交牛由山东绿润食品有限公司提供。随机选取5头2~3岁、生长发育状况良好、健康无病、体重均匀的西门塔尔杂交牛,宰前禁食24h、禁水2h。

试验试剂:丙二醛、牛血清白蛋白(BSA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、抗霉素A购于美国Sigma-Aldrich公司;盐酸、顺丁烯二酸、2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、磷酸氢二钾、磷酸氢二钾、铁氰化钾、亚铁氰化钾、氯化钾、乙二胺四乙酸(EDTA)、蔗糖、琥珀酸钠、乙醇、甲醇、氯仿购于天津光复科技发展有限公司,试验试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

TGL-16M型离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)、HT7700型透射电子显微镜(日本日立高新技术公司)、UV765PC型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、930A型荧光分光光度计(上海精科实业有限公司)、FA2004B型电子天平(上海佑科仪器有限公司)、XHF-D型高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司)、PHS-3C型酸度计(上海仪电科学仪器有限公司)、DNP-9162型水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集与制备

西门塔尔杂交牛集中屠宰后,立即取背最长肌,除去筋膜后切成质量250g、厚度5cm的肉块,真空包装后置于冰盒运回实验室,用于线粒体的分离和肌红蛋白的提取、纯化。

1.3.2 牛肉线粒体提取

参照Sun等^[10]的方法,取一定质量的背最长

肌,用 4℃ 生理盐水冲洗以除去残余血液,用滤纸吸去表面水分。然后取 50 g 样品,切碎后加入 500 mL 分离液 (250 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA,pH 值 7.4),在 12 000 r/min 条件下匀浆 2 min 后于 1 500 g、4℃ 离心 15 min,取上清液,在 12 000 g、4℃ 条件下离心 20 min,沉淀用分离液清洗 2 次后溶于缓冲液 (250 mmol/L 蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl,pH 值 7.4)即为线粒体悬浮液。以上过程均在 0~4℃ 条件下完成。线粒体蛋白浓度用双缩脲法测定。

1.3.3 线粒体膜通透性

参照王荣梅等^[11]的方法,稍作修改。线粒体悬浮液 (0.5 mg/mL) 和丙二醛 (0.1 mmol/L) 分别在 pH 值为 5.6 和 7.4 的缓冲液 (100 mmol/L MES、250 mmol/L 蔗糖) 中结合,25℃ 水浴孵化 60 min (以乙醇代替丙二醛做对照)。孵化过程中,分别在 0、20、40、60 min 测定混合溶液在 520 nm 波长下的吸光度,并依据吸光度的变化来判定线粒体膜通透性的改变。如果溶液在 520 nm 处吸光度降低,表明线粒体通透性增加,反之则表明线粒体通透性降低。

1.3.4 丙二醛与线粒体膜的结合能力

参照 Catalá^[12]的方法。将线粒体悬浮液 (2.5 mg/mL) 和丙二醛 (0.5 mmol/L) 分别在 pH 值为 5.6 和 7.4 的缓冲液 (100 mmol/L MES、250 mmol/L 蔗糖) 中结合,在 25℃ 水浴条件下孵化 60 min (对照用乙醇代替丙二醛)。孵化后取 3 mL 试样与 3 倍体积的氯仿/甲醇 (体积比 1:2) 混合,然后于 6 000 g、4℃ 下离心 15 min,上清液中加入 3 倍体积的氯仿/水 (体积比 1:1) 混合,于 6 000 g、4℃ 下离心 5 min,然后将样品从氯仿层移出,与等体积的甲醇/氯仿 (体积比 1:10) 混合。采用荧光分光光度计测定样品的相对荧光强度 (激发波长和发射波长分别为 360 nm 和 430 nm)。溶液相对荧光强度与线粒体膜中结合的丙二醛含量呈正比。

1.3.5 线粒体微观结构观察

参照 Yang 等^[13]的方法并稍做修改。线粒体悬浮液 (10 mg/mL) 和丙二醛 (1 mmol/L) 分别在 pH 值 5.6 (120 mmol/L 氯化钾、5 mmol/L 磷酸二氢钾、30 mmol/L 顺丁烯二酸) 和 pH 值 7.4 (120 mmol/L 氯化钾、5 mmol/L 磷酸二氢钾、30 mmol/L Tris-HCl) 的缓冲液中结合,25℃ 水浴孵化 60 min (对照用乙醇代替丙二醛)。按照 Khraiweh 等^[14]的方法制备线粒体电镜样品,利用透射电子显微镜观察线粒体微观结构的变化。

1.3.6 牛肉高铁肌红蛋白的制备

参照 Nair 等^[15]的方法纯化牛肉肌红蛋白。取

5 mL 纯化的肌红蛋白溶液,加入 50 mg 铁氰化钾,缓慢搅拌至混合均匀后静置 10 min,在 3 500 g、4℃ 条件下离心 15 min,收集上清液。溶液中多余的铁氰化钾采用 10 倍体积 50 mmol/L、pH 值 7.0 的磷酸缓冲液透析除去 (透析 24 h、换 10 次透析液)。采用双缩脲法^[10]测定溶液中蛋白质的含量。

1.3.7 线粒体电子传递链调控的高铁肌红蛋白还原能力

参照 Tang 等^[16]的方法,将线粒体悬浮液 (2.5 mg/mL) 与丙二醛 (0.2 mmol/L) 分别在 pH 值为 5.6 和 7.4 的缓冲液 (100 mmol/L MES、250 mmol/L 蔗糖) 中结合,25℃ 预孵化 30 min 后,加入高铁肌红蛋白 (0.15 mmol/L),然后加入琥珀酸钠 (5 mmol/L) 以启动电子呼吸链调控的高铁肌红蛋白还原过程,继续孵化 9 h (分别做琥珀酸钠和丙二醛的空白对照),分别在 0、3、6、9 h 测定混合液在 525、545、565、572 nm 波长下的吸光度。混合液中高铁肌红蛋白相对含量的计算公式为

$$C_{MMb} = (-2.514A_{572\text{ nm}}/A_{525\text{ nm}} + 0.777A_{565\text{ nm}}/A_{525\text{ nm}} + 0.800A_{545\text{ nm}}/A_{525\text{ nm}} + 1.098) \times 100\%$$

式中 C_{MMb} ——高铁肌红蛋白相对含量,%
 A_{λ} ——波长 λ 下的吸光度

1.3.8 线粒体 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶活性

参照 Elroy 等^[17]的方法,将线粒体悬浮液 (2.5 mg/mL) 与丙二醛 (0.2 mmol/L) 分别在 pH 值为 5.6 和 7.4 的缓冲液 (100 mmol/L MES、250 mmol/L 蔗糖) 中结合,为抑制线粒体电子呼吸链调控的高铁肌红蛋白还原,加入 0.02 mmol/L 抗霉素 A (电子呼吸链抑制剂),25℃ 预孵化 30 min (以乙醇代替丙二醛做对照)。然后加入高铁肌红蛋白 (0.15 mmol/L)、亚铁氰化钾 (3 mmol/L) 和 EDTA (5 mmol/L),加入 0.02 mmol/L NADH (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (还原态)) 以启动反应,25℃ 反应 2 min。高铁肌红蛋白和氧合肌红蛋白在 580 nm 处差异最大,摩尔消光系数为 $1.2 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$,通过比较反应前、后该波长下溶液吸光度的变化来计算高铁肌红蛋白还原酶的活力。高铁肌红蛋白还原酶的活力单位定义为:1 U 表示每分钟还原 1 nmol 高铁肌红蛋白,其活性表示为每毫克线粒体中高铁肌红蛋白还原酶的活力单位数 (U/mg)。

1.4 数据处理与统计分析

试验中所有测定均做 3 次重复,试验结果表示为平均值 ± 标准差。采用 SPSS 19.0 统计分析软件 (美国 IBM 公司) 进行试验数据处理,平均数之间的显著性差异 ($P < 0.05$) 通过 LSD 法进行比较分析,

用 Origin 8.0 软件(美国 OriginLab 公司)制图。

2 结果与分析

2.1 丙二醛对牛肉线粒体膜通透性的影响

由图 1 可知,线粒体和丙二醛在不同 pH 值条件下体外孵化过程中,线粒体悬浮液吸光度均比对照组有显著降低($P < 0.05$),说明丙二醛在体外

孵化过程中使线粒体膜通透性增大、使其发生肿胀,对线粒体结构造成了损伤。在 pH 值 5.6(贮藏条件)条件下线粒体悬浮液吸光度显著高于 pH 值 7.4(生理条件),并且 2 种 pH 值条件下吸光度分别降低了 3.95% 和 5.75% ($P < 0.05$),说明丙二醛在不同 pH 值条件下对线粒体膜通透性的影响存在一定差异。

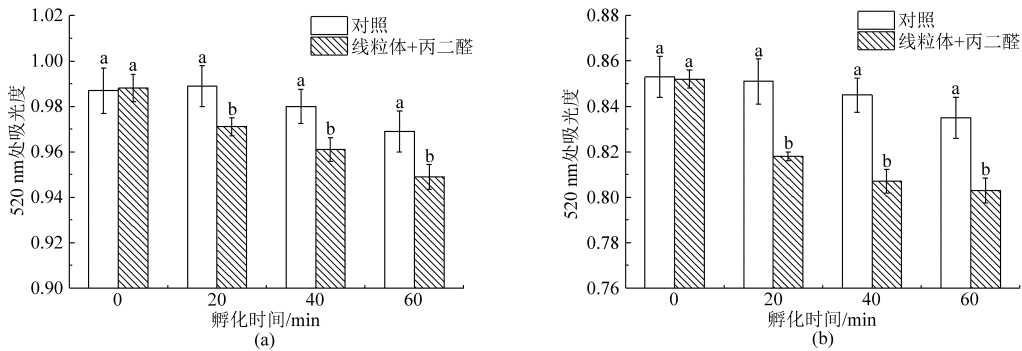


图 1 丙二醛对牛肉线粒体膜通透性的影响
Fig.1 Effect of malondialdehyde on mitochondria membrane permeability of bovine muscle
(a) pH 值 5.6 (b) pH 值 7.4

2.2 丙二醛与牛肉线粒体膜的结合能力

由图 2 可以看出,牛肉线粒体在不同的 pH 值条件下与丙二醛进行体外孵化后,线粒体悬浮液的荧光强度均显著升高($P < 0.05$),说明丙二醛能够结合到线粒体膜中。并且在 pH 值 7.4 条件下孵化,反应液产生的荧光强度明显较高,说明该条件下丙二醛结合到线粒体膜的能力更强,但是有关 pH 值对丙二醛细胞毒性影响的研究未见报道。

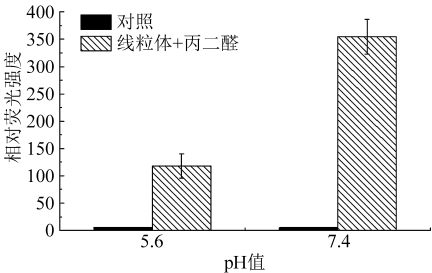


图 2 丙二醛与牛肉线粒体膜反应产物的荧光强度
Fig.2 Fluorescent intensity of products formed by malondialdehyde and mitochondria membrane of bovine muscle

2.3 丙二醛对牛肉线粒体微观结构的影响

由图 3 可以看出,未添加丙二醛的对照组(图 3a、3c)线粒体形态正常,网络结构明显、线粒体膜完整、嵴较为明显,而添加丙二醛并在 25℃ 条件下孵化 60 min 后(图 3b、3d),线粒体微观结构发生了不同程度的变化。对比 2 种 pH 值条件下线粒体与丙二醛孵化后的形态,表明在 pH 值 5.6 条件下,线粒体发生轻微肿胀、部分嵴消失、出现空泡状,但结构较完整、膜相对清晰。而在 pH 值 7.4 条件下,

线粒体微观结构破坏较前者严重,整体形态呈不规则状、发生凸起或凹陷、线粒体膜和特有的网络结构变得模糊。本结果表明,丙二醛对线粒体微观结构具有一定破坏作用,其破坏程度随孵化体系 pH 值的不同而有所差异。通过对线粒体形态的研究,验证了 2.1、2.2 节关于丙二醛对线粒体膜通透性及与其结合能力的研究结果。

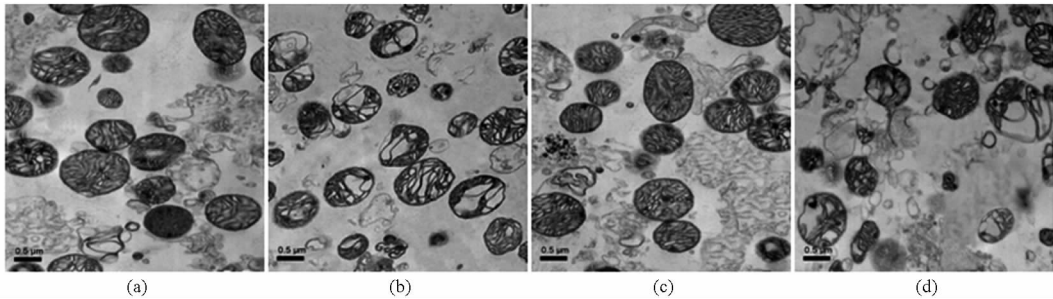
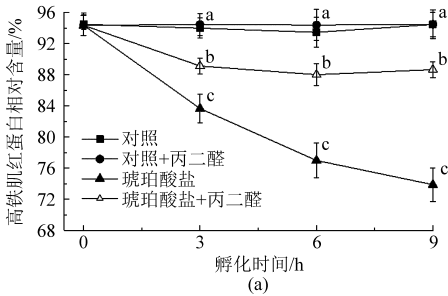


图 3 丙二醛对牛肉线粒体微观结构的影响(放大倍数为 10^4)
Fig.3 Effect of malondialdehyde on microstructure of bovine muscle mitochondria (magnified for 10^4 times)
(a) 对照, pH 值 5.6 (b) 线粒体 + 丙二醛, pH 值 5.6 (c) 对照, pH 值 7.4 (d) 线粒体 + 丙二醛, pH 值 7.4

2.4 丙二醛对线粒体电子传递链调控的高铁肌红蛋白还原能力的影响

由图 4 可知,在 pH 值 5.6 和 7.4 条件下,琥珀酸盐能促进高铁肌红蛋白的还原,丙二醛对线粒体电子传递链调控的高铁肌红蛋白还原能力有显著的抑制作用。当孵化体系中未添加琥珀酸盐时,丙二醛对高铁肌红蛋白还原的影响与对照组无差异。在孵化体系中加入琥珀酸盐,在 pH 值 5.6 条件下,高铁肌红蛋白相对含量在 9 h 后降低了 21.70% ($P < 0.05$),当孵化体系中存在丙二醛时,孵化 9 h 后高铁肌红蛋白相对含量仅降低了 6.02%,高铁肌红蛋



白还原量较前者低 15.68% ($P < 0.05$)。而在 pH 值 7.4 条件下高铁肌红蛋白相对含量在 9 h 后降低了 12.87% ($P < 0.05$),当孵化体系中存在丙二醛时,孵化 9 h 后高铁肌红蛋白相对含量仅降低了 6.26%,高铁肌红蛋白还原量较前者低 3.83% ($P < 0.05$)。结果表明,琥珀酸盐能够促进线粒体电子呼吸链调控的高铁肌红蛋白还原过程,并且当 pH 值为 5.6 时,其高铁肌红蛋白还原能力更强,而丙二醛能通过抑制线粒体电力呼吸链降低其还原高铁肌红蛋白的能力。

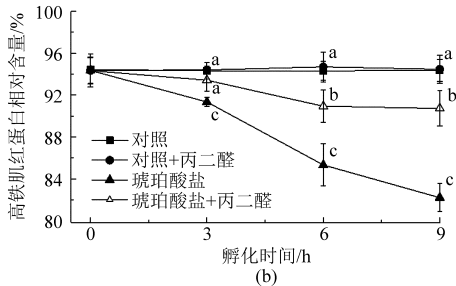


图 4 丙二醛对牛肉线粒体电子传递链调控的高铁肌红蛋白还原能力的影响
Fig. 4 Effect of malondialdehyde on electron transported chain mediated metmyoglobin reduction of bovine muscle mitochondria
(a) pH 值 5.6 (b) pH 值 7.4

2.5 丙二醛对线粒体 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶活力的影响

由图 5 可知,当 pH 值 5.6 和 7.4 时,牛肉线粒体与丙二醛孵化后其 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶的活力明显降低 ($P < 0.05$)。对照组中(未与丙二醛孵化)NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶活力在 pH 值 5.6 时 (36.98 U/mg) 显著低于 pH 值 7.4 (86.50 U/mg) ($P < 0.05$),当线粒体孵化 30 min 后,2 种 pH 值条件下该酶的活力分别降低 48.97% 和 47.80% ($P < 0.05$)。结果表明丙二醛在不同条件下均能够抑制 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶的活力,导致高铁肌红蛋白因无法及时还原而不断积累,如果这种作用在新鲜的牛肉中发生,会对其色泽稳定性产生不利的影响。

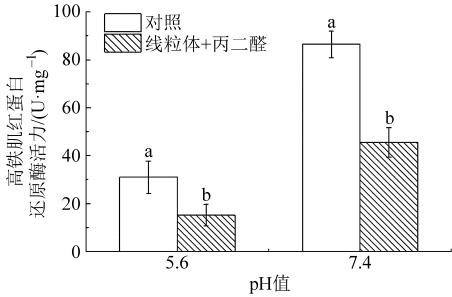


图 5 丙二醛对牛肉线粒体 NADH 依赖的高铁肌红蛋白还原酶活力的影响
Fig. 5 Effect of malondialdehyde on NADH-dependent reductase activity of bovine mitochondria

3 讨论

线粒体膜通透性的变化是衡量线粒体结构甚至是功能损伤的重要指标,相关研究中以线粒体悬浮液在 520 nm 波长下吸光度的变化来判断其通透性变化。如果在该波长下吸光度下降,表明线粒体膜发生肿胀、通透性增大,反之则说明线粒体发生收缩、通透性降低^[11]。Catalá^[12]指出脂质过氧化产物会改变线粒体膜的“流动镶嵌模型”,使线粒体膜的非均相体系发生改变,导致其结构以及功能的变化。Kristal 等^[18]认为脂质氧化产生的不饱和醛会通过刺激线粒体膜通透性转换孔使其膜孔变大,造成膜通透性增大。王荣梅等^[11]研究发现铜可以促进鸡肝线粒体膜脂质过氧化,产生的自由基和过氧化物可导致鸡肝线粒体通透性增大。本研究发现丙二醛能够使牛肉线粒体膜通透性增大,与上述研究结果相吻合,说明脂质过氧化产物可以造成线粒体结构的破坏,而多数研究将醛类物质的这种能力归因于其与线粒体膜的结合能力。

脂质氧化产生的醛类物质可以与生物膜磷脂中的端氨基(如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸)以及蛋白质残基(如组氨酸残基)结合产生荧光团,可以通过测定其荧光强度衡量脂质氧化产物与生物膜结合能力^[19]。Kristal 等^[18]证实了脂质氧化产生的醛类物质结合到小鼠线粒体膜使其通透性增加进而导致

线粒体生理功能丧失,这与本研究的结果相吻合。脂质氧化产生的丙二醛和 4-羟基壬烯醛能够造成小鼠肝细胞发生硬化、纤维化并引发肝脏病变,这是由于醛类物质共价结合到小鼠肝细胞膜蛋白及磷脂分子中造成的^[20]。牛肉线粒体不仅在宰后一定时间内对牛肉色泽稳定性具有调控作用,还能通过能量代谢途径促进牛肉的成熟及嫩化,对牛肉品质有重要影响^[21]。本研究发现丙二醛会与线粒体膜结合进而破坏其结构,这一结果通过线粒体微观结构的观察得到了印证。丙二醛这种细胞毒性作用可能会引起线粒体功能退化进而对牛肉的品质造成不利的影响。但是,pH 值是否影响丙二醛的细胞毒性作用还有待进一步研究,有报道指出生物膜本身就容易被所处环境酸碱性的影响,酸性条件会引起脂肪酸比例、蛋白质溶解性等的变化,从而影响线粒体膜的通透性^[22]。

鲜牛肉贮藏过程中由于氧化作用引起的高铁肌红蛋白的积累是导致肉色发生劣变的主要原因,线粒体呼吸链电子传递过程能够将高铁肌红蛋白还原,对维持肉色稳定性有重要作用^[2]。琥珀酸盐是三羧酸循环中间产物,也是线粒体呼吸链的电子来源,与线粒体膜中的复合物Ⅱ(琥珀酸-泛醌还原酶)作用后脱下的 H⁺ 传递给辅酶 Q,后者将 H⁺ 释放与介质中,而将电子经复合体Ⅲ(泛醌-细胞色素 c 还原酶)、细胞色素 c 和复合体Ⅳ(细胞色素 c 氧化酶)传递给高铁肌红蛋白进而将其还原^[23],这可能是本研究孵化体系中添加琥珀酸盐后高铁肌红蛋白还原能力明显增强的原因。然而,有研究表明脂质氧化产物可以抑制线粒体呼吸链电子传递,Long 等^[6]研究指出丙二醛能钝化线粒体中复合物Ⅰ、复合物Ⅱ及酮戊二酸脱氢酶,造成线粒体电子呼吸链生物氧化功能紊乱。Elroy 等^[17]和 Isom 等^[24]利用质谱技术证实了 4-羟基壬烯醛能与线粒体中的电子传递体(如细胞色素 c)共价结合,阻断其向高铁肌红蛋白血红素辅基传递电子的过程。Elroy 等^[17]还发现低的 pH 值更有利于线粒体调控的高铁肌红蛋白还原过程,与本研究的结果相吻合,这可能也与丙二醛在低 pH 值条件下对线粒体损伤作用相对较小有关。

高铁肌红蛋白酶促还原系统主要由酶(细胞色

素 b5 还原酶)、中间电子传递体(细胞色素 b5)和氢供体(NADH)组成^[17]。该系统还原高铁肌红蛋白的途径为:细胞色素 b5 还原酶首先将 NADH 中的电子转移给细胞色素 b5,被还原的细胞色素 b5 再将电子传递到高铁肌红蛋白的血红素辅基中,从而使三价态的铁离子还原为二价态^[25]。目前还没有关于丙二醛对 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶活力影响的研究,本研究中与丙二醛孵化后导致线粒体 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶活力降低,其原因可能是醛类物质能共价结合到高铁肌红蛋白中,导致其构型改变,从而抑制高铁肌红蛋白的酶促还原过程^[26]。此外,本研究中不同条件下线粒体 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶活力可能也受到孵化体系 pH 值的影响,Rodríguez 等^[27]在相似的体外孵化研究中表明该酶的活力与 pH 值关系密切,随着孵化体系 pH 值的降低,酶活力呈显著减小趋势。综上所述,丙二醛对线粒体调控的高铁肌红蛋白还原能力的影响可分为 2 个方面:一是结合于线粒体膜,引起线粒体结构损伤而导致其生物功能紊乱;二是直接作用于线粒体 2 种还原高铁肌红蛋白的生化途径,抑制高铁肌红蛋白的还原过程。

4 结 论

- (1)丙二醛能结合于牛肉线粒体膜中,导致线粒体发生肿胀、变形、膜通透性增大、嵴消失等不可逆损伤。并且其损伤程度在模拟生理 pH 值条件(pH 值 7.4)下明显更高。
- (2)丙二醛能抑制牛肉线粒体呼吸链电子传递作用,导致线粒体电子呼吸链调控的高铁肌红蛋白还原能力下降。而线粒体中 NADH 型高铁肌红蛋白还原酶活力同样受到丙二醛的抑制,这些作用会对鲜牛肉色泽稳定性造成不利的影响。
- (3)线粒体对高铁肌红蛋白不同的还原途径还与 pH 值有密切的关系,较低的 pH 值有利于线粒体电子呼吸链调控的高铁肌红蛋白还原过程,但是会抑制 NADH 依赖型高铁肌红蛋白还原酶的活力。
- (4)鲜牛肉在贮藏过程中脂质氧化是丙二醛等物质的主要来源。因此,在鲜牛肉贮藏过程中,延缓脂质氧化进程以及维持线粒体正常的呼吸作用,对于维持牛肉色泽稳定性有重要的意义。

参 考 文 献

1 Suman S P, Joseph P. Myoglobin chemistry and meat color[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2013(4): 79 - 99.

2 Tapp W N, Yancey J W S, Apple J K, et al. Noni puree (*Morinda citrifolia*) mixed in beef patties enhanced color stability[J]. Meat Science, 2012, 91(2): 131 - 136.

3 Ramanathan R, Mancini R A, Joseph P, et al. Bovine mitochondrial oxygen consumption effects on oxymyoglobin in the presence of lactate as a substrate for respiration[J]. Meat Science, 2013, 93(4): 893 - 897.

- 4 Lindahl G. Colour stability of steaks from large beef cuts aged under vacuum or high oxygen modified atmosphere[J]. *Meat Science*, 2011, 87(4): 428–435.
- 5 Gao X, Wang Z, Tang M, et al. Comparison of the effects of succinate and NADH on postmortem metmyoglobin reductase activity and beef colour stability[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13(8): 1817–1826.
- 6 Long J, Wang X, Gao H, et al. Malonaldehyde acts as a mitochondrial toxin: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria[J]. *Life Sciences*, 2006, 79(15): 1466–1472.
- 7 姚仕彬, 叶元土, 蔡春芳, 等. 丙二醛对离体草鱼肠道黏膜细胞的损伤作用[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 133–141.
- 8 Wakita C, Honda K, Shibata T, et al. A method for detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in proteins[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 51(1): 1–4.
- 9 Duryee M J, Klassen L W, Schaffert C S, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 49(10): 1480–1486.
- 10 Sun L, Luo C, Long J, et al. Acrolein is a mitochondrial toxin: effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria[J]. *Mitochondrion*, 2006, 6(3): 136–142.
- 11 王荣梅, 曹华斌, 李和平, 等. 高铜对肉鸡肝线粒体膜通透性、脂类代谢及肝和肌肉铜含量的影响[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(2): 243–246.
- 12 Catalá A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model” [J]. *Biochimie*, 2012, 94(1): 101–109.
- 13 Yang S, Tan T M C, Wee A, et al. Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61(2): 220–229.
- 14 Khraiweh H, López-Domínguez J A, del Río L F, et al. Mitochondrial ultrastructure and markers of dynamics in hepatocytes from aged, calorie restricted mice fed with different dietary fats[J]. *Experimental Gerontology*, 2014, 56: 77–88.
- 15 Nair M N, Suman S P, Li S, et al. Lipid oxidation-induced oxidation in emu and ostrich myoglobins[J]. *Meat Science*, 2014, 96(2): 984–993.
- 16 Tang J, Faustman C, Mancini R A, et al. Mitochondrial reduction of metmyoglobin: dependence on the electron transport chain [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(13): 5449–5455.
- 17 Elroy N N, Rogers J, Mafi G G, et al. Species-specific effects on non-enzymatic metmyoglobin reduction in vitro[J]. *Meat Science*, 2015, 105: 108–113.
- 18 Kristal B S, Park B K, Byung P Y. 4-hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(11): 6033–6038.
- 19 Vazdar M, Jurkiewicz P, Hof M, et al. Behavior of 4-hydroxynonenal in phospholipid membranes[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(22): 6411–6415.
- 20 Khan M F, Wu X, Tipnis U R, et al. Protein adducts of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal in livers of iron loaded rats: quantitation and localization[J]. *Toxicology*, 2002, 173(3): 193–201.
- 21 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, 202.
- Sun Zhichang, Feng Xiaoqin, 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, 202. (in Chinese)
- 22 钱静亚, 马海乐, 李树君, 等. 脉冲磁场对枯草芽孢杆菌细胞膜流动性的影响[J]. *农业机械学报*, 2013, 44(11): 202–207.
- Qian Jingya, Ma Haile, Li Shujun, et al. Effects of the pulsed magnetic field on membrane fluidity of *Bacillus subtilis* [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2013, 44(11): 202–207. (in Chinese)
- 23 Genova M L, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2014, 1837(4): 427–443.
- 24 Isom A L, Barnes S, Wilson L, et al. Modification of cytochrome c by 4-hydroxy-2-nonenal: evidence for histidine, lysine, and arginine-aldehyde adducts[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2004, 15(8): 1136–1147.
- 25 Shirabe K, Yubisui T, Borgese N, et al. Enzymatic instability of NADH-cytochrome b5 reductase as a cause of hereditary methemoglobinemia type I (red cell type) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(28): 20416–20421.
- 26 Lynch M P, Faustman C. Effect of aldehyde lipid oxidation products on myoglobin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(3): 600–604.
- 27 Rodríguez G, Kim Y H B, Faget S, et al. Lactate-mediated enzymatic reduction of metmyoglobin in vitro[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(2): 732–735.