

低氧因子介导脯氨酰羟化酶对牦牛肉肉色稳定性的影响

辛可启¹ 田凯¹ 余群力¹ 胡博¹ 孔祥颖² 张新军³

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 青海省海北畜牧兽医科学研究所, 海北 812200;
3. 青海海晏夏华肉食品公司, 海北 812200)

摘要: 探讨了低氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 介导脯氨酰羟化酶 (Proline hydroxylase domain, PHD) 调控糖酵解酶活性及宰后牦牛肉肉色稳定性的变化, 以牦牛背最长肌为研究对象, 经过二甲基乙二酰氨基乙酸 (Dimethyloxalylglycine, DMOG) 和利非西呱 (Lifigiquat, YC-1) 处理, 通过测定 PHD 活力、 a^* 值、糖酵解酶活性、线粒体功能、Mb 特性等指标的变化来探究 PHD 对宰后牦牛肉肉色稳定性的影响。研究表明: 与对照组相比, DMOG 组的 LDH 活力、MRA 含量、NADH 含量、OMb 含量和 MMb 含量均在 6~72 h 显著升高 ($P < 0.05$), 而 DMOG 组的 PHD 活力、线粒体膜电位、DMb 含量和 NAD^+ 含量显著降低 ($P < 0.05$), 同时 DMOG 组的 Mb 二级结构稳定性也高于对照组, YC-1 组的作用均与 DMOG 组相反。综上, HIF-1 α 介导 PHD 通过下调 LDH 及 MRA 的活性和影响线粒体的功能, 降低 NADH 含量, 使 MMb 无法被还原为 OMb。同时, 该通路还会使 Mb 二级结构稳定性下降, 最终导致肉色稳定性降低, 肉色发生劣变。

关键词: 脯氨酰羟化酶; 低氧诱导因子-1 α ; 肉色稳定性

中图分类号: TS251.52 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2023)03-0421-10 OSID: 

Effects of Prolyl Hydroxylase on Stability of Meat Color
by Hypoxia Inducible Factor-1 α

XIN Keqi¹ TIAN Kai¹ YU Qunli¹ HU Bo¹ KONG Xiangying² ZHANG Xinjun³

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China
2. Haibei Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science of Qinghai Province, Haibei 812200, China
3. Qinghai Haiyan Xiahua Meat Food Company, Haibei 812200, China)

Abstract: The effects of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) mediating proline hydroxylase domain (PHD) on glycolysis activity and color stability of yak meat after slaughter were investigated. The longissimus dorsi muscle of yak was treated with dimethyloxalylglycine (DMOG) and Lifigiquat (YC-1). The effects of PHD on color stability of postmortem yak meat were investigated by measuring PHD activity, a^* value, related enzyme activity, mitochondrial function and Mb characteristics. The results were as follows: compared with the control group, LDH activity, MRA, NADH content, OMb content and MMb content in DMOG group were significantly increased from 6 h to 72 h ($P < 0.05$), while PHD activity, mitochondrial membrane potential, DMb content and NAD^+ content in DMOG group were significantly decreased ($P < 0.05$). Meanwhile, the Mb secondary structure stability of DMOG group was higher than that of control group, and the effect of YC-1 group was opposite to that of DMOG group. In conclusion, HIF-1 α -mediated PHD reduced NADH content and prevented MMb from being reduced to OMb by down-regulating LDH and MRA activities and affecting mitochondrial function. Therefore, HIF-1 α mediated PHD to reduce NADH content by down-regulating LDH and MRA activities and affecting mitochondrial function, so that MMb cannot be reduced to OMb. At the same time, this pathway would also reduce the stability of Mb secondary structure, and eventually lead to reduced meat color stability, and meat color deterioration. The research investigated the differences in meat quality during postmortem

收稿日期: 2022-05-31 修回日期: 2022-07-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060553)、甘肃省重点研发计划项目(20YF3NA016)和财政部和农业农村部;国家现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系建设专项(CARS-37)

作者简介: 辛可启(1995—),女,博士生,主要从事畜产品加工研究,E-mail: xinkeqi2020@163.com

通信作者: 余群力(1962—),男,教授,博士生导师,主要从事畜产品贮藏加工研究,E-mail: yuqunl@sau@163.com

aging of yak meat at different altitudes and the relationship between hypoxic factor HIF-1 α release and meat quality.

Key words: prolyl hydroxylase; hypoxia inducible factor-1 α ; color stability

0 引言

PHD 是一类依赖 O₂、 α -酮戊二酸和 Fe²⁺ 的非血红素双加氧酶,其主要介导宰后 HIF-1 α (低氧诱导因子-1 α) 氧依赖的羟基化降解^[1]。而 HIF-1 α 为 HIF-1 重要的氧敏感活性调节亚基,在常氧环境下,HIF-1 α 的羟基化位点 P402、P564 会被 PHD 羟基化,希佩尔林道肿瘤抑制蛋白 (Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, pVHL) 与之结合,最终通过蛋白酶体途径降解^[2]。而在缺氧环境中,由于缺少作为底物的 O₂ 分子,PHD 活性下降,HIF-1 α 氧依赖的羟基化降解受阻,HIF-1 α 得以积累,并结合 HIF-1 β 形成 HIF-1,进而识别下游信号分子的缺氧反应元件 (Hypoxia response element, HRE),上调其活性与表达,以此形成缺氧反应调节通路^[3]。

牦牛生活在高海拔低氧严寒的恶劣环境中,为了适应低氧环境,其体内进化出一系列的低氧适应机制,其中 HIF-1 α 作为重要的低氧调节转录因子,在低氧适应的分子机制中起着重要的作用^[4]。牦牛生活在远离污染的高原地区,一直被认为是一种优质畜产品^[5]。在消费者选购肉制品时,肉品质往往直接决定消费者的购买欲望,而其中肉色是最为直观的评价指标,通常认为鲜红色为肉新鲜的表征^[6]。对充分放血的肌肉来说,其颜色主要取决于肌红蛋白的含量及其化学状态^[7]。宰后肌肉处于缺血断氧的状态,没有足够的 O₂ 分子与 Mb 作用,低氧肌红蛋白 (Deoxymyoglobin, DMb) 在此时占据主要优势,肉色呈紫红色。当肌肉暴露于充足的 O₂ 中时,大量的 DMb 在 O₂ 分子的作用下转化为氧合肌红蛋白 (Oxymyoglobin, OMb),使肉色鲜红。但 DMb 和 OMb 中的 Fe²⁺ 不稳定,极易失去电子被氧化为 Fe³⁺,当肌肉长时间暴露在空气中时,DMb 和 OMb 逐渐转化为高铁肌红蛋白 (Metmyoglobin, MMb),肉色逐渐变为褐色^[8]。肉色稳定性会受到多方面因素的影响^[9]。鉴于肉色的重要意义,肉色稳定性的评价就显得尤为重要。

文献[10]探究了 HIF-1 对滩羊肉宰后初期能量水平及肉色的影响,其研究指出宰后成熟 2~48 h 内滩羊肉 HIF-1 表达量与能量物质水平、肉色及 pH 值均呈显著相关,并推测 HIF-1 可能通过调控宰后糖酵解及肌肉 pH 值影响肉色。在前

期的研究中课题组发现 YC-1 (利非西呱)^[11] 和 DMOG (二甲基乙二酰氨基乙酸)^[12] 可调控 HIF-1 α 的表达,而鉴于 PHD 对 HIF-1 α 氧依赖羟基化降解的重要作用,本文在宰后成熟过程中通过调控 HIF-1 α 的表达探究 HIF-1 α 介导 PHD 途径对牦牛肉肉色的影响,以期对宰后肌肉肉色的调控提供一定的理论依据。

1 试验

1.1 试验材料 with 处理

牦牛样本采自青海裕泰畜产品有限公司,选择发育正常、健康无病、平均年龄 2~4 岁、平均体质量 (200 $\pm$ 20) kg 的牦牛 6 头。宰前禁食 16 h,禁水 2 h,屠宰放血后取背最长肌,剔除表面筋膜,切分为适宜大小的肉块。分别对肉块注射生理盐水、DMOG 和 YC-1,DMOG 和 YC-1 的浓度均为 100 mol/L,均匀地用 20 G 针穿刺后与相应溶液 1 g/mL 混合浸泡^[11-12]。在干法成熟条件下成熟 0、3、6、12、24、48、72、120、168 h 后取样,a* 值、Mb 含量测定和线粒体透射电镜观察由于简单易操作,同时为了避免冻存对肉品质的影响,在对应成熟时间点取样后立即测定对应指标。而剩余指标的测定因其测定方法复杂,不便立即测定,且冻存对其指标无显著影响,因此将肉样冻存于-80℃待用。

1.2 试验仪器与试剂

FJ200-SH 型分散均质机,上海沪析实业有限公司;TGL-24MC 型高速台式冷冻离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司;DW-86L416G 型超低温冰箱,青岛海尔生物医疗有限公司;SP-756P 型紫外可见分光光度计,上海光谱有限公司;RF5301-PC 型荧光分光光度计,日本岛津公司;CR-410 型色彩色差计,KONICA MINOLTA 公司;Great 50 型红外光谱仪,天津中科瑞捷科技有限公司。

DMOG,北京索莱宝科技有限公司;YC-1,西格玛奥德里奇贸易有限公司;脯氨酰羟化酶试剂盒,上海江莱生物科技有限公司;乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒,NADH/NAD⁺ (还原型辅酶 I/辅酶 I) 试剂盒,线粒体膜电位试剂盒,南京建成生物工程研究所;肌红蛋白,上海源叶生物科技有限公司;硫酸铵,亚铁氰化钾,醋酸铅,EDTA (乙二胺四乙酸),天津市致远化学试剂有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 PHD 活力测定

参照脯氨酰羟化酶试剂盒说明书。称取 0.1 g 肉样,加入 0.9 mL 的生理盐水,冰浴匀浆,在 4℃, 2 500 r/min 离心 10 min,取上清待测。在标准孔中加入 50 μL 标准品,样本孔中加入 50 μL 匀浆液,再加入检测抗体 100 μL,37℃ 水浴 60 min。弃去液体,清洗后加入底物 A、B 各 50 μL,重复水浴操作,加入终止液后于 450 nm 处测定其吸光度。PHD 活力计算公式为

$$P_{HD} = \frac{C(A - A_0)}{131(A_1 - A_0)} \tag{1}$$

式中 P_{HD} ——PHD 活力,U/g
 C ——待测样本质量摩尔浓度,μmol/g
 A_0 ——空白吸光度
 A ——测定吸光度
 A_1 ——用于 PHD 活力测定的标准吸光度

1.3.2 a^* 值测定

取一表面平整的肉样,随机选取 3 个位置,使用色彩色差计进行测定,待示数稳定后记录。

1.3.3 Mb 含量测定

参考文献[13]的方法。称取 2 g 肉样,加入 20 mL 缓冲液,冰浴匀浆后于 4℃、5 000 g 离心 15 min,过滤后于 576 nm 处测定吸光度 A_{576} 。Mb 质量摩尔浓度的公式为

$$C_{mb} = \frac{A_{576}}{12.8m} V \times 1\,000 \tag{2}$$

式中 C_{mb} ——Mb 质量摩尔浓度,μmol/g
 V ——体积,mL m ——质量,g
 A_{576} ——吸光度

1.3.4 LDH 活力测定

参照乳酸脱氢酶试剂盒说明书。称取 1 g 肉样,加入缓冲液和应用液,37℃ 水浴 15 min。加入 0.25 mL 2,4-二硝基苯肼,重复水浴操作。加入 2.5 mL NaOH 溶液,反应 3 min 后于 440 nm 处测定吸光度。LDH 活力的公式为

$$L_{DH} = \frac{2(A - A_1)}{n(A_2 - A_0)} \tag{3}$$

式中 L_{DH} ——LDH 活力,U/g
 A_2 ——用于 LDH 活力测定的标准吸光度
 n ——匀浆蛋白质量摩尔浓度,μmol/g

1.3.5 MRA 含量测定

参考文献[14]的方法,并针对本研究稍作修改。取 5 g 肉样,加入 10 mL 提取液,冰浴匀浆,于 4℃、10 000 g 条件下离心 20 min,过滤,用 $K_3Fe(CN)_6$ 完全氧化 OMb,而后置于 4℃ 透析 24 h,

透析过程中换 5 次透析液。透析完毕后于 4℃、10 000 g 条件下离心 20 min,用 pH 值 7.0、2.0 mmol/L 的 PBS(磷酸缓冲盐溶液)定容至 20 mL (表 1)。

表 1 高铁肌红蛋白测定反应体系
Tab.1 Metmyoglobin assay reaction system

反应物	浓度/(mmol·L ⁻¹)	体积/mL
EDTA	5.0	0.10
PBS(pH 值 7.0)	50.0	0.10
K ₃ Fe(CN) ₆	3.0	0.10
去离子水		0.10
MMb 标准液	0.75	0.20
MRA 酶液		0.60
NADH	2.0	0.20

加入 NADH 后于 580 nm 处测定吸光度。公式为

$$D = 10^9 \Delta AV / (\varepsilon v l m) \tag{4}$$

式中 ε ——消光系数,L/(mol·cm)
 l ——比色杯光径,cm
 v ——样品体积,mL

1.3.6 NADH 和 NAD⁺ 含量的测定

参照 NADH/NAD⁺ 试剂盒说明书。称取 0.1 g 肉样,加入 1 mL 碱性提取液,冰浴研磨后沸水浴 5 min,待冷却后 4℃、10 000 g 离心 10 min,取上清加入等体积的酸性提取液中和,4℃、10 000 g 离心 10 min,取上清。依序加入试剂 1~5 避光反应 20 min。加入试剂 6 反应 5 min,20 000 g 离心 5 min,取沉淀,加入试剂 7 后于波长 570 nm 处测定吸光度。公式为

$$N_{ADH} = 19.4(A - A_1 - 0.065) / W \tag{5}$$

式中 N_{ADH} ——NADH 质量摩尔浓度,nmol/g
 W ——浓度

$$N_{AD+} = 72.2(A - A_1 - 0.099) / W \tag{6}$$

式中 N_{AD+} ——NAD⁺ 质量摩尔浓度,nmol/g

1.3.7 线粒体透射电子显微镜观察

参考文献[15]的方法,利用透射电镜观察肌原纤维间线粒体。将肌肉切成 10 mm×1 mm×1 mm 的薄片,置于 2.5% 戊二醛中固定 24 h。用磷酸盐缓冲液洗涤肉样,用 1% 四氧化锇再次固定 1 h 后,用乙醇溶液脱水。最后,将样品用 100% 的环氧丙烷和不同比例的包埋剂分别在 35℃ 和 45℃ 下养护 12 h,然后将温度提高到 60℃ 养护 24 h。制备的样品用超微切片机切片,用乙酸铀酰和柠檬酸铅染色,最后在透射电子显微镜下观察。

1.3.8 线粒体膜电位测定

参照线粒体膜电位试剂盒说明书。取 0.1 mL

100 μg/mL 的线粒体,加入 0.9 mL 的 JC-1 染料工作液反应 20 min。随后使用荧光分光光度计立即测量荧光值。单体和聚集激发检测的激发波长分别为 490 nm 和 525 nm,发射波长分别为 530 nm 和 590 nm。线粒体膜电位用单体荧光值与聚集荧光值之比来表示。

1.3.9 Mb 氧化程度测定

参考文献[16]的方法。取 3 g 肉样,加入 15 mL 磷酸缓冲液,冰浴匀浆,置于 4℃ 50 min 后 3 300 r/min 离心 15 min。过滤后分别在 525、545、565、572 nm 处测定吸光度。公式为

$$D_{Mb} = (0.369R_1 + 1.140R_2 - 0.941R_3 + 0.015) \times 100\%$$
(7)

$$O_{Mb} = (0.882R_1 - 1.267R_2 + 0.809R_3 - 0.361) \times 100\%$$
(8)

$$M_{Mb} = (0.777R_2 - 2.514R_1 + 0.800R_3 + 1.098) \times 100\%$$
(9)

其中 $R_1 = A_{572}/A_{525}$ (10)

$R_2 = A_{565}/A_{525}$ (11)

$R_3 = A_{545}/A_{525}$ (12)

式中 D_{Mb} 、 O_{Mb} 、 M_{Mb} ——DMb、OMb、MMb 质量分数
 A_{525} 、 A_{545} 、 A_{565} 、 A_{572} ——525、545、565、572 nm 处吸光度

1.3.10 Mb 二级结构变化测定

参考文献[17]的方法,称取 10 g 肉样,加入 50 mL 提取液,冰浴匀浆,置于 4℃ 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,过滤后加入 (NH₄)₂SO₄ 至溶液饱和,置于 4℃ 30 min。4℃、12 000 r/min 离心 30 min,取沉淀。加入 20 mL Tris-HCl,置于透析袋中透析 24 h,在此过程中多次置换透析液。将透析完成的 Mb 在冷冻干燥机中干燥,取 1~2 mg Mb 粉末在扫描红外光谱仪中扫描 400~4 000 cm⁻¹。随后使用 Peakfit 4.12 软件提取 1 600~1 700 cm⁻¹ 的数据进行高斯拟合分析,得到 Mb 二级结构含量的变化。

1.4 数据统计分析

所有统计分析均使用 SPSS 21.0 进行,用 Duncans 多重比较验证各指标在不同时间点及不同处理组之间在 $P < 0.05$ 水平上的差异显著性,用 Origin 9.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 牦牛肉宰后成熟过程中 PHD 活力

PHD 是调节 HIF-1α 表达的关键酶,在 HIF-1α 氧依赖的羟基化降解中起着关键作用^[18]。从图 1(图中不同小写字母表示组间差异显著,不同大写字母表示组内差异显著,下同)可以看出,DMOG

组、YC-1 组和对照组的 PHD 活力均随成熟时间的延长不断下降。与 0 h 相比,在 168 h 时,DMOG 组的 PHD 活力下降了 62.89%,YC-1 组的下降了 42.61%,而对照组的下降了 53.85%。这可能是由于 DMOG 与 YC-1 对 HIF-1α 及 PHD 的作用所导致的($P < 0.05$)。文献[19]探究了大鼠缺氧肺动脉的 PHD 与 HIF-1α 的相互调节作用,发现 PHD1、PHD3 mRNA 随着缺氧时间的延长逐渐降低,同时其研究指出 HIF-1α 与 PHD2、3 mRNA 呈显著正相关($P < 0.05$)。这与本文的研究结果一致,也进一步说明了 PHD 与 HIF-1α 之间的调控作用。由于 PHD 家族成员均能引起 HIF-1α 脯氨酸位点的羟基化,因此本研究并未区分 PHD 家族成员,而只是对 PHD 总活性做一评价。DMOG 是可渗透细胞、竞争型的 HIF-1α 脯氨酰羟化抑制剂^[20]。因此经过 DMOG 处理的肌肉细胞中的 PHD 活性被抑制,从试验结果来看该处理是成功的,且对 PHD 具有显著的抑制作用。而 YC-1 可通过介导 NO 的合成以抑制 HIF-1α 的表达,文献[21]通过构建低氧细胞模型发现:随着缺氧时间增加,HIF-1α 表达水平提高,同时 PHD3 mRNA 表达增多;而抑制 HIF-1α 可降低 PHD3 的表达。也有研究指出 PHD2 和 PHD3 也是 HIF-1 的靶基因^[22]。说明 HIF-1α 与 PHD 之间存在负反馈调节,YC-1 处理后抑制了 HIF-1α 的表达,从而使得 PHD 的活性有所升高。综上,PHD 随成熟时间的延长其活性逐渐降低,其活性的变化受到 HIF-1α 的调控。

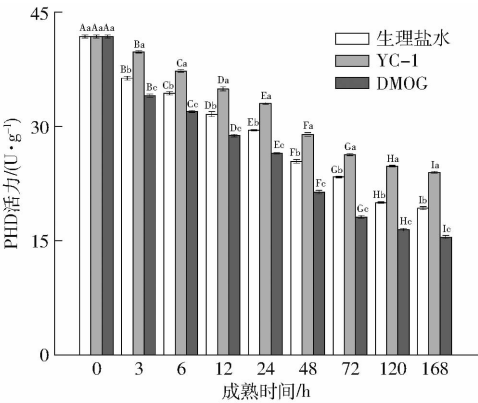


图 1 宰后成熟过程中 PHD 活力的变化

Fig. 1 Changes of PHD activity during postmortem ripening

2.2 牦牛肉宰后成熟过程中 a* 值

肉色可以作为评价肉制品新鲜程度的指标,直接影响消费者的选购欲望^[23]。由图 2 可得,DMOG 组、YC-1 组和对照组的 a* 值均在 24 h 前呈上升趋势,24 h 后趋于平缓。a* 在宰后 0 h 均为 15.75,且均于宰后 24 h 达到最高值,3 个组 a* 值的最高值分别为 23.91、20.22、21.53 ($P < 0.05$)。文献[24]研

究指出不同 pHu 值的牛肉其 a^* 值均随成熟时间的延长呈先升后降的趋势,这与本文的研究结果一致。这可能是因为宰后 a^* 值上升的原因归结为线粒体的呼吸作用产生的 NADH,其可上调 MRA,加速 MMb 转化为 OMb 的过程^[25]。但随着成熟的继续进行,肌肉的氧气含量逐渐下降,而渗透进入肌肉内部的氧气被线粒体消耗,造成局部氧分压过低,使得 Mb 的铁离子处于还原态,而且较多的 DMb 存在易被氧化成 MMb,使得 a^* 值降低^[26]。文献[10]发现 HIF-1 表达量与 a^* 值呈极显著正相关($P < 0.01$),并推测 HIF-1 对肉色的调控可能与 LDH 及 NADH 的作用有关。综上,HIF-1 α 介导 PHD 会使肌肉的 a^* 值下降,使肉色发生劣变。

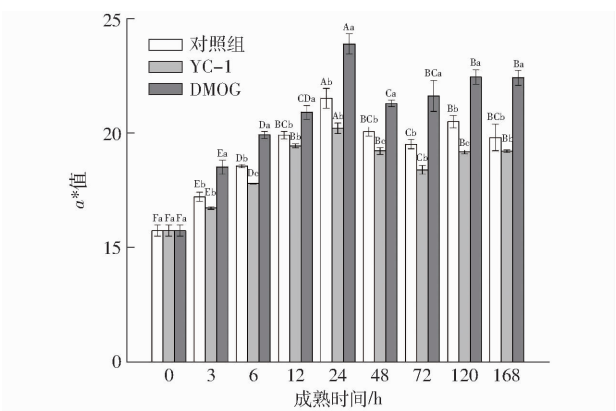


图 2 宰后成熟过程中 a^* 值的变化

Fig. 2 Changes of a^* value during postmortem ripening

2.3 牦牛肉宰后成熟过程中 Mb 含量

在放血充分的肌肉中,肉色主要取决于 Mb 的含量与氧化程度。由图 3 可知,DMOG 组、YC-1 组和对照组的 Mb 含量均随着成熟时间的延长持续下降。在 168 h 时,3 个组的 Mb 含量均为 0 h 时的 41.55% 左右,而 Mb 含量的变化为多方面因素共同作用的结果。文献[27]测定了在冷藏过程中扁舵鲮肉中 Mb 含量的变化,指出在 0~9 d 肌肉中的 Mb 含量呈下降趋势,这与本文的测定结果一致。Mb 含量下降是由于 Mb 是水溶性蛋白,会随着渗出水分的增多而逐渐减少^[28]。也有研究指出随着成熟的进行,脂质氧化产物会诱发 Mb 变性,导致其可测含量降低^[29]。肌肉中 Mb 含量直接决定利用 O_2 能力,从而影响动物对低氧环境的适应性^[30]。文献[31]研究对比了不同海拔牦牛肌肉中的 Mb 含量,指出高海拔牦牛为了适应低氧环境,提高 O_2 利用率,肌肉中含有更高的 Mb。但在本研究中,由于宰后肌肉中 Mb 的合成停止,因此抑制或激活 PHD 并未对其产生影响。综上,HIF-1 α 介导 PHD 不会对宰后肌肉中的 Mb 含量产生影响,其对宰后肉色的影响可能通过其他途径实现。

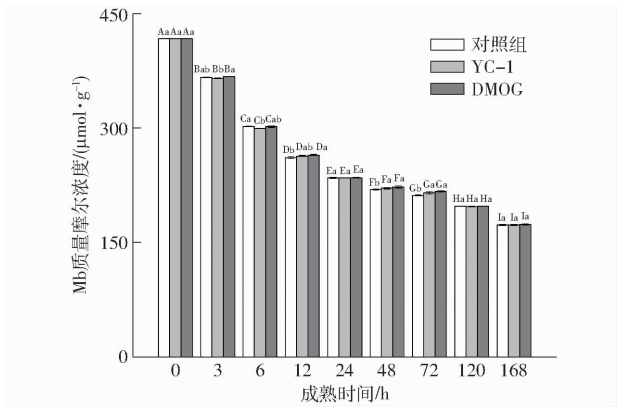


图 3 宰后成熟过程中 Mb 含量的变化

Fig. 3 Changes of Mb content during postmortem ripening

2.4 牦牛肉宰后成熟过程中 LDH 活力

LDH 参与乳酸-丙酮酸的转化过程,在改变细胞内环境方面起着重要作用^[32]。从图 4 可以看出,DMOG 组、YC-1 组和对照组的 LDH 活力随成熟时间的延长均先升高后降低,并均于 12 h 达到最高值。DMOG 组与处理组相比,LDH 活力始终显著高于对照组 ($P < 0.05$),而 YC-1 组的 LDH 活力在 3~24 h 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。于 24 h 时 DMOG 组与 YC-1 组的差异最大,DMOG 组的活力较 YC-1 组高 9.57%。LDH 活力主要受到 HIF-1 α 的影响,HIF-1 α 表达量越高,LDH 活力越高。文献[33]发现在冷藏条件下,肌肉中的 LDH 活力于宰后 0~12 h 显著增加 ($P < 0.05$),并于 12 h 达到最高值,在 24 h 之后 LDH 活力逐渐降低,在 168 h 时 LDH 活力逐渐趋于稳定,这与本文的研究结果一致。文献[34]对比了不同 HIF-1 α 表达水平下 LDH 活力,发现 HIF-1 α 表达量与 LDH 活力呈显著正相关 ($P < 0.05$)。而当抑制 PHD 后,HIF-1 α 表达水平得以升高,因此出现了 DMOG 组中 LDH 活力更高的现象,而 YC-1 组中的 PHD 表达升高,LDH 活力更低。综上,HIF-1 α 通过加速 PHD 的降解进而下调 LDH 活力。

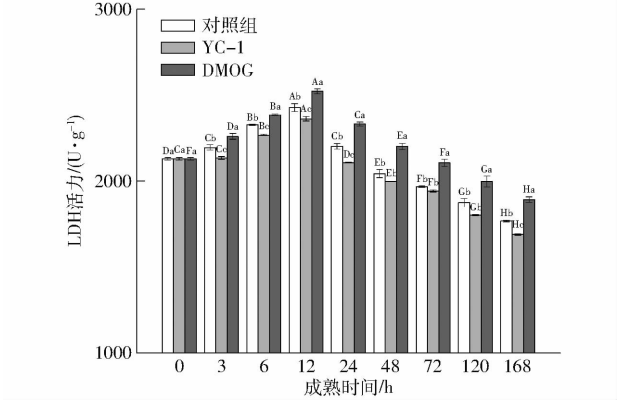


图 4 宰后成熟过程中 LDH 活力的变化

Fig. 4 Changes of LDH activity during postmortem ripening

2.5 牦牛肉宰后成熟过程中 MRA 含量变化率

MRA 可维持 Mb 血红素辅基中铁离子的还原状态,以保持理想的 OMb 水平,以维持肉色稳定性^[35]。由图 5 可得,DMOG 组、YC-1 组和对照组的 MRA 质量摩尔浓度变化率随成熟时间的延长均不断降低,在整个成熟过程中,DMOG 组的 MRA 质量摩尔浓度变化率降低 34.62%,YC-1 组降低 40.92%,对照组降低 37.50% ($P < 0.05$)。目前的报道尚未见 DMOG 及 YC-1 对 MRA 的作用,因此推测这可能和 PHD 与 HIF-1 α 之间的调控密切相关。文献[36]测定了牛排贮藏期间 MMb 还原能力的变化,结果显示,MMb 还原能力随成熟时间的延长持续降低,这与本文的研究结果一致。同时其研究还指出 MRA 的高低和 NADH 与 NAD⁺ 二者间的转化有关。在动物机体中,MMb 还原酶能够利用 NADH 将 MMb 还原为 DMb,因此 MMb 在动物机体中的含量较低^[37]。而在宰后肌肉中,MMb 还原酶是维持肉色稳定性的重要内部因素。MMb 还原酶组成复杂,包括 NADH 脱氢酶、NADPH 醌还原酶、NADH 醌氧化还原酶和 NADPH 细胞色素 C2 还原酶等^[38]。本研究还发现 DMOG 组的 MRA 高于对照组,而 YC-1 组的 MRA 低于对照组,说明 PHD 介导 HIF-1 α 会下调 MRA。由于 MMb 还原酶组成复杂,通过本研究尚不能明确具体的作用酶及作用机制,仍需更深入的研究来探明。综上,HIF-1 α 介导 PHD 可降低宰后肌肉中 MRA 含量,使肉色稳定性降低。

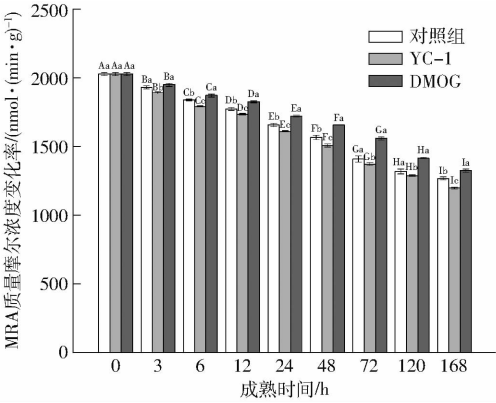


图 5 宰后成熟过程中 MRA 的变化

Fig.5 Changes of MRA during postmortem ripening

2.6 牦牛肉宰后成熟过程中 NADH 和 NAD⁺ 含量

NADH 是糖酵解途径中的还原性辅酶 I,承担着电子传递体的功能,能够将 MMb 还原成 OMb,提高肉色稳定性^[39]。由图 6、7 可知,DMOG 组、YC-1 组和对照组的 NADH 含量均随着成熟时间的延长先升高后降低,而 NAD⁺ 含量先下降后上升,且二者转变的趋势节点均在 12 h,由于 NADH 与 NAD⁺ 之

间存在相互转化,其变化趋势对应。DMOG 组的 NADH 含量始终显著高于对照组 ($P < 0.05$),而 NAD⁺ 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$),YC-1 组与之相反,YC-1 组的 NADH 含量较对照组显著降低而 NAD⁺ 含量显著升高 ($P < 0.05$)。NADH 与 NAD⁺ 在糖酵解途径中的反应式如下:丙酮酸 + NADH + H⁺ → 乳酸 + NAD⁺ + 2H。NADH 在糖酵解途径中能够作为电子传递体将 MMb 还原,以提高肉色稳定性。文献[40]指出肌肉中的乳酸在 LDH 的作用下转化为丙酮酸和 NADH,提高了肉色稳定性。LDH 以 NAD⁺ 为辅基,催化乳酸转化为丙酮酸,并使 NAD⁺ 转化为 NADH^[41]。由于 LDH 在维持肉色稳定性方面能够发挥重要作用,上文中也指出 PHD 介导 HIF-1 α 可以下调 LDH 活性,因此出现了 DMOG 组 NADH 含量较对照组更高,NAD⁺ 含量更低的现象。综上,HIF-1 α 介导 PHD 通过下调宰后肌肉中的 LDH 活力,使 NADH 含量下降,进而降低肉色稳定性。

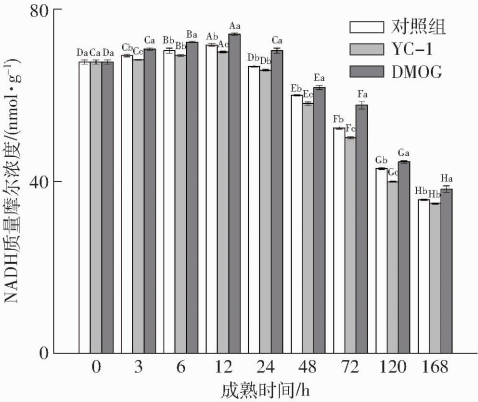


图 6 宰后成熟过程中 NADH 含量的变化

Fig.6 Changes of NADH content during postmortem ripening

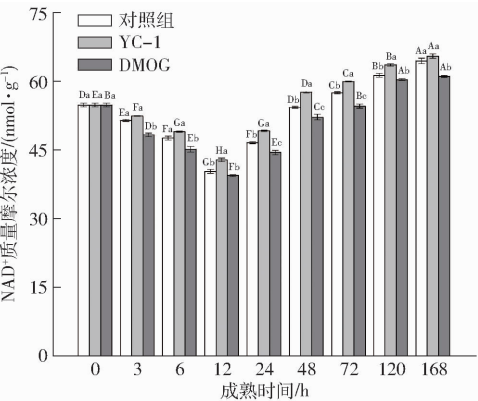


图 7 宰后成熟过程中 NAD⁺ 含量的变化

Fig.7 Changes of NAD⁺ content during postmortem ripening

2.7 牦牛肉宰后成熟过程中线粒体形态和膜电位

线粒体在畜禽宰后仍维持较高活性,显著影响肌肉氧分压、电子传递链、MRA 等生理生化功能,是调控 MMb 还原活性的重要细胞器^[41]。由图 8 可以看

出,在宰后前期可以观察到完整的线粒体外膜轮廓,但随着成熟的继续进行,线粒体的形态逐渐发生变化,逐渐呈现出碎片化的趋势,在 168 h 已经较难观察到清晰的外膜轮廓。此外,DMOG 组、YC-1 组和对照组之间并未观察到线粒体形态上的差异。说明 HIF-1 α 介导 PHD 并未对线粒体形态产生影响。但鉴于线粒体对肉色稳定性的重要作用,本研究进一步探究了 HIF-1 α 对线粒体功能的影响。从图 9 可知,随着成熟时间的延长,线粒体膜电位呈逐渐下降的趋势。与对照相比,DMOG 组的线粒体膜电位在成熟过程中始终显著低于对照组($P < 0.05$),而 YC-1 组显

著高于对照组($P < 0.05$)。文献[42]研究了乳酸-乳酸脱氢酶体系对线粒体的作用,发现线粒体膜电位在宰后成熟 1、3、5、7 d 整体呈逐渐下降的趋势,这与本研究结果一致。文献[12]的研究指出 HIF-1 α 在死后肌肉过程中不改变线粒体完整性,但可以降低线粒体膜电位。同时其研究还指出 HIF-1 α 可能通过丙酮酸脱氢酶激酶影响线粒体的功能。而在本文中 DMOG 处理上调了 HIF-1 α 的表达,因此线粒体膜电位较对照组降低。综上,HIF-1 α 介导 PHD 不会影响线粒体形态,但会使线粒体膜电位丧失,造成线粒体损伤,使肉色稳定性下降。

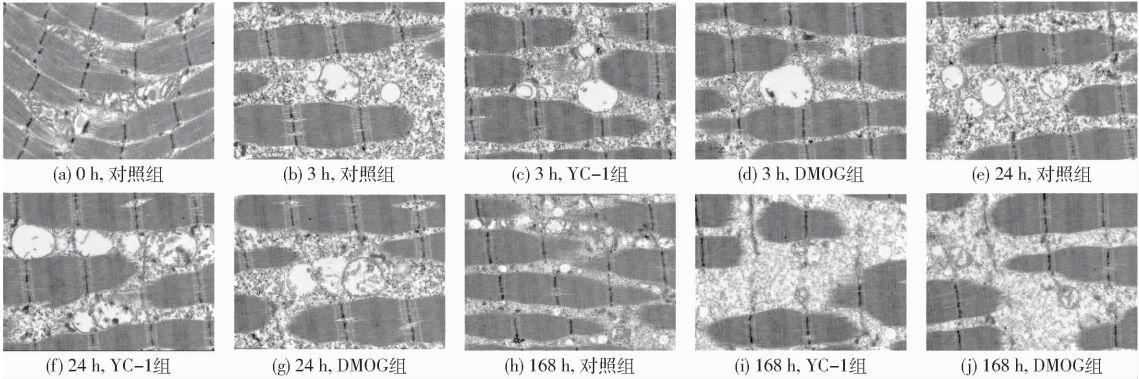


图 8 透射电镜图

Fig. 8 Transmission electron microscopy

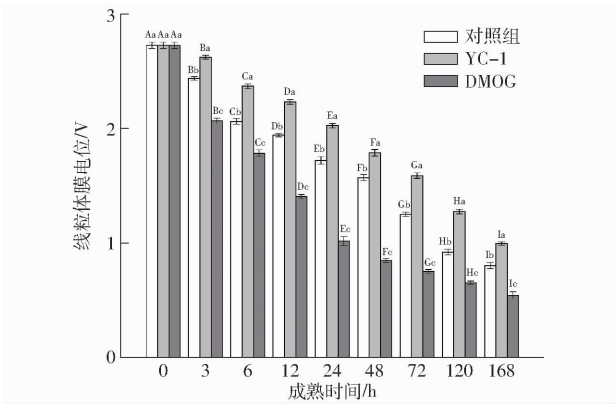


图 9 宰后成熟过程中线粒体膜电位的变化

Fig. 9 Changes in mitochondrial membrane potential during postmortem ripening

2.8 牦牛肉宰后成熟过程中 Mb 氧化程度

肉的呈色主要来自于肌肉中的 Mb, Mb 的存在形式有 DMb、OMb 和 MMb,三者含量决定最终肉色的呈现。从图 10 ~ 12 可以看出,随着成熟时间的延长,DMOG 组、YC-1 组和对照组的 DMb 含量不断下降,在整个成熟过程中,除 3 h 和 24 h 外,DMOG 组的 DMb 含量始终显著低于对照组($P < 0.05$),YC-1 组的 DMb 含量显著高于对照组($P < 0.05$);OMb 含量先升高后下降,24 h OMb 含量达到最高值,DMOG 组的 OMb 含量除成熟时间 3 h 和 168 h 外均显著高于对照组($P < 0.05$),

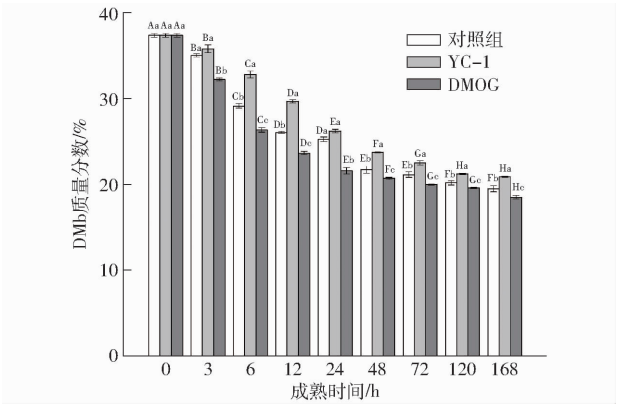


图 10 宰后成熟过程中 DMb 含量的变化

Fig. 10 Changes of DMb content during postmortem ripening

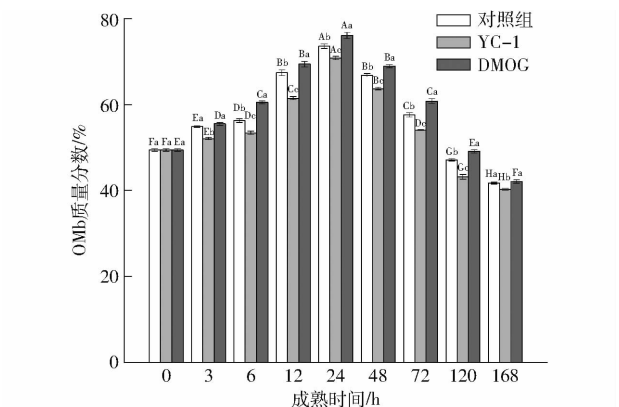


图 11 宰后成熟过程中 OMb 含量的变化

Fig. 11 Changes of OMb content during postmortem ripening

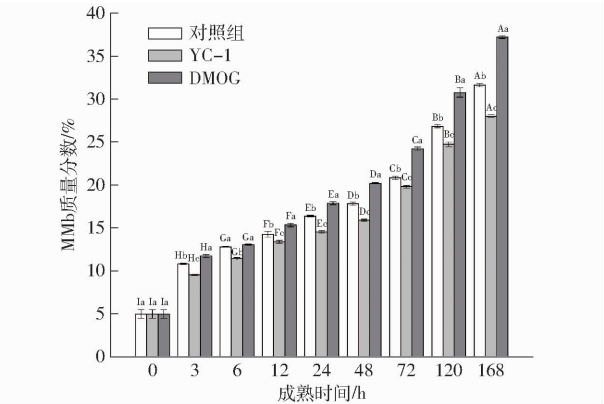


图 12 宰后成熟过程中 MMb 含量的变化

Fig. 12 Changes of MMb content during postmortem ripening

YC-1 组的 DMb 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$) ; MMb 含量呈不断上升的趋势,且在 3 h 后 DMOG 组的 MMb 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$),YC-1 组的 MMb 含量较对照组显著降低 ($P < 0.05$)。文献[43]测定了冷藏 1、3、5、7 d 时牛肉的 Mb 氧化程度,指出随着成熟时间的延长,牛肉背最长肌的 DMb、MMb 含量呈逐渐下降趋势,而 OMb 含量呈逐渐上升趋势。本研究的测定结果与之相一致。鉴于上文中 PHD/HIF-1 α 通路对 MRA 的影响,推测 PHD 介导 HIF-1 α 会下调肌肉中 MRA,使 MMb 无法还原为 OMb,因此 MMb 含量升高,OMb 含量降低,使肉色发生劣变。综上,说明 HIF-1 α 介导 PHD 会使 DMb 含量上升,OMb 和 MMb 含量下降,降低肉色稳定性。

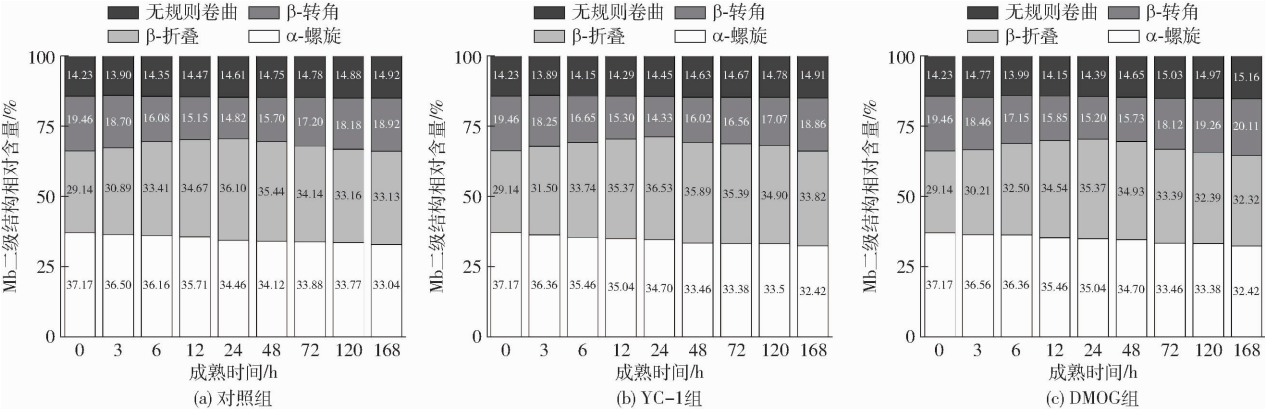


图 13 宰后成熟过程中 Mb 二级结构的变化

Fig. 13 Changes of secondary structure of Mb during postmortem ripening

级结构的稳定性降低,进而降低肉色稳定性。

3 结束语

在牦牛肉宰后成熟过程中,DMOG 组的 OMb 含量、MMb 含量、NADH 含量、MRA 含量、Mb 二级结构稳定性较对照组有所增加,而 PHD 活性、

2.9 牦牛肉宰后成熟过程中 Mb 二级结构

蛋白质二级结构主要包括 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲 4 种,前两种有序,后两种无序,可用以评价蛋白质的稳定性[44]。由图 13 可得,DMOG 组、YC-1 组和对照组的 α -螺旋含量均随成熟时间的延长逐渐下降, β -折叠含量先升后降, β -转角含量先降后升,无规则卷曲含量逐渐升高。DMOG 组的 α -螺旋和 β -折叠含量之和高于对照组, β -转角和无规则卷曲含量之和则是对照组更高。而 YC-1 组的作用效果与 DMOG 组相反。DMOG 组的 α -螺旋和 β -折叠相对含量之和在 66.24% ~ 71.23% 之间,YC-1 组的二者之和在 64.74% ~ 70.41% 之间,而对照组在 66.17% ~ 70.56% 之间。 α -螺旋和 β -折叠含量之和可以反映蛋白质二级结构的稳定性。文献[45]采用拉曼光谱测定了牛肉贮藏过程中的 Mb 二级结构的变化,其研究结果与本文的变化规律一致。随着成熟的进行,Mb 二级结构中的 α -螺旋逐渐转化成 β -折叠和无规卷曲结构,由有序的结构逐渐变得无序,Mb 二级结构的稳定性下降,最终导致 Mb 作为色素蛋白的功能减弱[46]。这也印证了上文中 Mb 含量在宰后成熟过程中的变化。本研究还指出,PHD 介导 HIF-1 α 降低了 Mb 二级结构的稳定性。综合先前的研究推测:HIF-1 α 介导 PHD 引起的 Mb 二级结构稳定性差异可能与 pH 值的变化有关。综上,PHD 介导 HIF-1 α 会使 Mb 二

线粒体膜电位和 DMb 含量较对照组降低,YC-1 组的趋势与之相反。推测 HIF-1 α 介导 PHD 通过下调 LDH 及 MRA 活性并影响线粒体功能,降低 NADH 含量,使 MMb 无法还原为 OMb,同时,该通路还会降低 Mb 二级结构的稳定性,使肉色发生劣变。

参 考 文 献

[1] 李佩尧, 张成岗. 细胞内低氧感受器:缺氧诱导因子-1 脯氨酰羟化酶研究进展[J]. 生理科学进展, 2007,38(1): 62 – 65.

[2] KONDO K, KAE LIN W G. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene[J]. Experimental Cell Research, 2001, 264(1): 117 – 125.

[3] 徐文琳, 钱令嘉, 张成岗, 等. 缺氧诱导因子 1 与缺氧信号转导机制[J]. 生理科学进展, 2003, 34(2): 169 – 170.

[4] 魏登邦, 马建宾. 哺乳动物对高海拔低氧适应的分子机制研究进展[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2001,19(1): 15 – 17,21.

WEI Dengbang, MA Jianbin. Research progress on the molecular mechanism of mammalian adaptation to high altitude hypoxia [J]. Journal of Qinghai University (Natural Science Edition), 2001,19(1): 15 – 17,21. (in Chinese)

[5] 孙鹏飞, 刘书杰, 崔占鸿. 牦牛肉产量及其品质特性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015,36(17): 169 – 175.

SUN Pengfei, LIU Shujie, CUI Zhanhong. Research progress on the yield and quality characteristics of yak meat [J]. Food Research and Development, 2015,36(17): 169 – 175. (in Chinese)

[6] LIANG R R, ZHU H, MAO Y W, et al. Tenderness and sensory attributes of the longissimus lumborum muscles with different quality grades from Chinese fattened yellow crossbred steers[J]. Meat Science, 2015, 112(10): 52 – 57.

[7] HENRIOTT M L, HERRERA N J, RIBEIRO F A, et al. Impact of myoglobin oxygenation state prior to frozen storage on color stability of thawed beef steaks through retail display[J]. Meat Science, 2020, 170(14): 108232.

[8] BREWER S. Irradiation effects on meat color—a review[J]. Meat Science, 2004, 68(1): 1 – 17.

[9] D’ALESSANDRO A, MARROCCO C, ZOLLA V, et al. Meat quality of the longissimus lumborum muscle of Casertana and Large White pigs: metabolomics and proteomics intertwined[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(2): 610 – 627.

[10] 姬琛, 杨波, 罗瑞明, 等. 缺氧诱导因子对滩羊肉宰后初期能量水平及肉色的影响[J]. 食品科学,2022,43(17):36 – 41.

JI Chen, YANG Bo, LUO Ruiming, et al. Effects of hypoxia-inducible factor on the energy level and meat color of Tan mutton in the early post-mortem[J]. Food Science,2022,43(17):36 – 41. (in Chinese)

[11] 胡博,辛可启,余群力,等. 脯氨酰羟化酶对宰后牦牛肉糖酵解及肉品质的影响[J]. 食品科学,2022,43(18):9 – 15.

HU Bo, XIN Keqi, YU Qunli, et al. Effect of prolyl hydroxylase on glycolysis and meat quality of yak meat after slaughter [J]. Food Science,2022,43(18):9 – 15. (in Chinese)

[12] XIN K Q, HU B, HAN L, et al. Study on the HIF-1 α regulated by glycolytic pathways and mitochondrial function in yaks of different altitudes during postmortem aging[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(8): e14205.

[13] 马兰, 杨应忠, 靳国恩, 等. 藏羚羊与藏绵羊心肌、骨骼肌中肌红蛋白含量和乳酸脱氢酶活性的比较[J]. 动物学杂志, 2012, 47(3): 35 – 39.

MA Lan, YANG Yingzhong, JIN Guoen, et al. Comparison of myoglobin content and lactate dehydrogenase activity in cardiac and skeletal muscles of Tibetan antelope and Tibetan sheep [J]. Journal of Zoology, 2012, 47(3): 35 – 39. (in Chinese)

[14] 马骋. 不同含氧气调包装方式对牦牛肉保鲜效果和肉色稳定性的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.

[15] YU Q, TIAN X, SHAO L, et al. Mitochondria changes and metabolome differences of bovine longissimus lumborum and psoas major during 24 h postmortem[J]. Meat Science, 2020, 166: 108112.

[16] KRZYWICKI K. The determination of heam pigments in meat[J]. Meat Science, 1982, 7(1): 29 – 35.

[17] 郑娅, 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.

ZHENG Ya, HU Shenghai, HE Yuanxiang, et al. Purification of beef myoglobin and analysis of its synergistic lipid oxidation effect [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(12): 111 – 116. (in Chinese)

[18] 夏冰清, 杨帆, 张硕, 等. 脯氨酰羟化酶研究进展及其与肿瘤的关系[J]. 南通大学学报(医学版), 2010, 30(2): 142 – 145,147.

XIA Bingqing, YANG Fan, ZHANG Shuo, et al. Research progress of prolyl hydroxylase and its relationship with tumors[J]. Journal of Nantong University (Medical Edition), 2010, 30(2): 142 – 145,147. (in Chinese)

[19] 陈云荣, 戴爱国, 胡瑞成. 缺氧诱导因子 1 α 与其脯氨酰羟化酶相互调控对大鼠缺氧性肺动脉高压的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006(10): 668 – 673.

CHEN Yunrong, DAI Aiguo, HU Ruicheng. The effect of hypoxia-inducible factor 1 α and its prolyl hydroxylase on hypoxic pulmonary hypertension in rats [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Medicine, 2006(10): 668 – 673. (in Chinese)

[20] BAADER E, TSCHANK G, BARINGHAUS K H, et al. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase by oxalyl amino acid derivatives in vitro, in isolated microsomes and in embryonic chicken tissues[J]. Biochemical Journal, 1994, 300(2): 525 – 530.

[21] CIOFFI C L, LIU X Q, KOSINSKI P A, et al. Differential regulation of HIF-1 α prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003,303(3):947 – 953.

[22] WOHLFART P, MALINSKI T, RUETTEN H, et al. Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase[J]. British Journal of Pharmacology, 1999, 128(6): 1316 – 1322.

[23] 罗亚兰. 乳酸脱氢酶在冷却牛肉肉色稳定性和高铁肌红蛋白还原中的作用机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.

[24] 李鹏. 不同极限 pH 值牛肉成熟过程中品质变化及变化机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.

[25] GADIYARAM K M, KANNAN G, PRINGLE T D, et al. Effects of postmortem carcass electrical stimulation on goat meat

quality characteristics[J]. Small Ruminant Research, 2008, 78(1-3):106-114.

[26] GEORGE P, STRATMANN C J. The oxidation of myoglobin to metmyoglobin by oxygen. 2. The relation between the first order rate constant and the partial pressure of oxygen[J]. Biochemical Journal, 1952, 51(3):418.

[27] 林森森,戴志远. 扁舵鲣脂肪氧化分析及其对肌红蛋白氧化的影响[J]. 肉类工业, 2019(6):23-30.
LIN Sensen, DAI Zhiyuan. Analysis of fat oxidation in bonito platypus and its effect on myoglobin oxidation [J]. Meat Industry, 2019(6):23-30. (in Chinese)

[28] 黄卉,孙申宇,魏涯,等. 红色肉贮藏期间肌红蛋白与肉色变化研究进展[J]. 南方水产科学, 2020, 16(3):119-124.
HUANG Hui, SUN Shenyu, WEI Ya, et al. Research progress on changes in myoglobin and meat color during storage of red meat [J]. Southern Fisheries Science, 2020, 16(3):119-124. (in Chinese)

[29] CHAIJIAN M, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastreuiger kanagurta*) muscle during iced storage[J]. Food Chemistry, 2005, 93(4):607-617.

[30] 王海燕,彭增起. 肌红蛋白的功能特性[J]. 肉类工业, 2001(7):36-40.
WANG Haiyan, PENG Zengqi. Functional properties of myoglobin[J]. Meat Industry, 2001(7):36-40. (in Chinese)

[31] 高永芳. CaCl₂ 处理对不同海拔高度牛肉宰后成熟过程中 AMPK 活性、能量代谢及肉质影响的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.

[32] XIN J Z, LI X, LI M, et al. Meat color stability of ovine muscles is related to glycolytic dehydrogenase activities[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(10-12):2432-2438.

[33] 李培迪,李欣,李铮,等. 冰温贮藏对宰后肌肉成熟进程的影响[J]. 中国农业科学, 2016, 49(3):554-562.
LI Peidi, LI Xin, LI Zheng, et al. Effects of controlled freezing point storage on aging from muscle to meat[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(3):554-562. (in Chinese)

[34] 李世昌,邹飞,段桂波. 低氧和长时间游泳运动对小鼠骨骼肌低氧诱导因子 1 α 和糖代谢酶活性的影响[J]. 中国临床康复, 2006(28):82-84.
LI Shichang, ZOU Fei, DUAN Guibo. Effects of hypoxia and prolonged swimming exercise on the activities of hypoxia-inducible factor 1 α and glucose metabolism enzymes in skeletal muscle of mice[J]. China Clinical Rehabilitation, 2006(28):82-84. (in Chinese)

[35] 马国源. 低剂量亚硝酸钠抑制牦牛肉肌红蛋白氧化的作用机制[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021.

[36] 杨啸吟. 高氧与一氧化碳气调包装对冷却牛排肉色稳定性影响的机理探究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.

[37] GENOVA M L, LENZA G. Functional role of mitochondrial respiratory super complexes[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1837(4):427-443.

[38] GAO X G, WANG Z Y, TANG M T, et al. Comparision 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.

[39] 孙申宇,黄卉,魏涯,等. 罗非鱼红色肉在冷藏期间的肉色稳定性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18):33-40.
SUN Shenyu, HUANG Hui, WEI Ya, et al. Flesh color stability of tilapia red meat during refrigeration [J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(18):33-40. (in Chinese)

[40] KIM Y H, HUNT M C, MANCINI R A, et al. Mechanism for lactate-color stabilization in injection-enhanced beef[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(20):7856-7862.

[41] 张佳莹. 线粒体通路信号介导细胞凋亡机制及对宰后牛肉嫩化影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.

[42] 张玉斌,李丙子,雷芸,等. 基于乳酸-LDH 的牦牛肉 NADH 线粒体介导再生研究[J]. 农业机械学报, 2020, 51(6):353-359.
ZHANG Yubin, LI Bingzi, LEI Yun, et al. Effects of lactage-LDH system on NADH regeneration and metmyoglobin reduction in yak beef of mitochondria-mediated in vitro[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(6):353-359. (in Chinese)

[43] 陈景宜. 冷却牛肉褪色的生化因素分析及肉色稳定性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.

[44] SULHATTIN Y, RAMAZAN T, ZEYNEP S, et al. Fungal fermentation inducing improved nutritional qualities associated with altered secondary protein structure of soybean meal determined by FTIR spectroscopy[J]. Measurement, 2020, 161:107895.

[45] 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.
ZHANG Tonggang, LUO Ruiming, LI Yalei, et al. Analysis of myoglobin structure changes during beef storage by Raman spectroscopy [J]. Food Science, 2019, 40(7):15-19. (in Chinese)

[46] 李可,赵颖颖,康壮丽,等. NaCl 对猪肉糜加工特性和蛋白质二级结构的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(15):77-81.
LI Ke, ZHAO Yingying, KANG Zhuangli, et al. Effects of NaCl on processing properties and protein secondary structure of minced pork [J]. Food Science, 2017, 38(15):77-81. (in Chinese)