

# 甘油醛-3-磷酸对羊肉色泽稳定性和高铁肌红蛋白还原的影响

辛建增<sup>1,2,3</sup>, 李 铮<sup>1</sup>, 李 欣<sup>1</sup>, 李桂霞<sup>1</sup>, 任 驰<sup>1</sup>, 张德权<sup>1,\*</sup>

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 2. 内蒙古科技大学生命科学与技术学院, 内蒙古 包头 014010;

3. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘 要:** 目的: 甘油醛-3-磷酸 (3-phosphoglyceraldehyde, GAP) 是糖酵解过程的代谢产物, 其能够在甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的催化下, 生成还原型辅酶I (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH), 而NADH会通过促进高铁肌红蛋白的还原而提高宰后肌肉色泽的稳定性。但GAPDH催化GAP产生的NADH能否直接作用于高铁肌红蛋白的还原并不明确。因此, 该研究的目的在于探究添加GAP对肉色稳定性的影响及其作用途径。方法: 采用原位模型和离体模型, 在原位模型中将GAP添加到羊肉样品中, 测定色差值及NADH含量; 离体模型中, 提取羊心肌中的线粒体, 分别与高铁肌红蛋白、GAP等共同孵育, 测定高铁肌红蛋白的占比。结果: 原位模型中, 向羊肉中添加GAP, 显著升高了样品的红度值和NADH含量。离体模型中, GAP与GAPDH共同孵育显著降低了高铁肌红蛋白的占比, 并且会增加孵育体系的氧气消耗率。结论: 添加GAP提高羊肉的色泽稳定性, 是由于GAP在肉中GAPDH催化下生成的NADH能够直接被用于还原高铁肌红蛋白, 进而延缓了高铁肌红蛋白的累积, 肉色稳定性较高。

**关键词:** 肉色; 甘油醛-3-磷酸; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 还原型辅酶I; 高铁肌红蛋白还原

## Effect of Glyceraldehyde-3-Phosphate on Color Stability and Metmyoglobin Reduction of Mutton

XIN Jianzeng<sup>1,2,3</sup>, LI Zheng<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, LI Guixia<sup>1</sup>, REN Chi<sup>1</sup>, ZHANG Dequan<sup>1,\*</sup>

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. School of Life Science and Technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China;

3. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** Purpose: Glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) is an intermediate metabolite of glycolysis, which can be catalyzed into NADH by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and NADH can improve metmyoglobin reduction resulting in improved meat color stability. However, it is not clear whether the formation of NADH catalyzed by GAPDH can be directly used for the reduction of metmyoglobin. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of adding GAP on the stability of meat color and to elucidate the underlying mechanism. Methods: *In situ* and *in vitro* models were used in the present study. GAP was added to mutton samples in the *in situ* model, and then instrumental color parameters and NADH content were determined; the myocardial mitochondria isolated from sheep were incubated with metmyoglobin and GAP, respectively, and the proportion of metmyoglobin was measured in *in vitro* model. Results: The addition of GAP to mutton significantly increased redness and NADH content in *in situ* model. The proportion of metmyoglobin was reduced significantly in *in vitro* model; meanwhile, the oxygen consumption rate increased during the incubation. Conclusion: The addition of GAP could increase the color stability of mutton, which was catalyzed by GAPDH into NADH to directly reduce metmyoglobin, thereby inhibiting the accumulation of metmyoglobin and consequently leading to higher color stability.

**Keywords:** meat color; GAP; GAPDH; NADH; reduction of metmyoglobin

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816017

收稿日期: 2017-07-24

基金项目: 国家农业科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2016-IFST); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303083);

现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-39)

第一作者简介: 辛建增 (1984—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为肉品科学与工程。E-mail: jianzeng77@sina.com

\*通信作者简介: 张德权 (1972—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为肉品科学与工程。E-mail: dequan\_zhang0118@126.com

中图分类号: TS251.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 16-0112-06

引文格式:

辛建增, 李铮, 李欣, 等. 甘油醛-3-磷酸对羊肉色泽稳定性和高铁肌红蛋白还原的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(16): 112-117. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816017. <http://www.spkx.net.cn>

XIN Jianzeng, LI Zheng, LI Xin, et al. Effect of glyceraldehyde-3-phosphate on color stability and metmyoglobin reduction of mutton[J]. Food Science, 2018, 39(16): 112-117. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816017. <http://www.spkx.net.cn>

色泽是消费者购买生鲜肉时的重要评价指标<sup>[1]</sup>, 而生肉色泽劣变通常会被认为是其营养品质发生了劣变<sup>[2-3]</sup>, 这会引起销售困难, 导致经济损失<sup>[4-5]</sup>。在充分放血的鲜肉中, 肉色主要是由肌肉中的肌红蛋白含量及不同状态占比所决定的<sup>[3]</sup>。Ledward等<sup>[6]</sup>研究指出, 高铁肌红蛋白还原可能是宰后维持肉色稳定最重要的因素, 还原型辅酶I (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 是高铁肌红蛋白还原 (包括酶促反应和非酶促反应) 时必要的还原当量<sup>[7]</sup>, 它能够在高铁肌红蛋白还原酶的作用下将高铁肌红蛋白还原为脱氧肌红蛋白, 脱氧肌红蛋白与氧气结合后生成亮红色的氧合肌红蛋白, 是消费者认可的亮红色<sup>[8]</sup>。

研究表明糖代谢过程中的中间产物乳酸、丙酮酸、谷氨酸、琥珀酸等添加到肉中, 均能够起到稳定肉色的作用, 这是由于添加的底物在肌肉中相关脱氢酶作用下, 生成NADH, 发挥稳定肉色的作用<sup>[9-12]</sup>。此外, 添加的底物还具有抑制脂肪氧化的作用, 间接发挥稳定肉色的作用<sup>[10,13]</sup>。甘油醛-3-磷酸 (3-phosphoglyceraldehyde, GAP) 是糖酵解过程中的中间代谢产物, 其在甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的催化下能够生成NADH和1,3-二磷酸甘油酸<sup>[14-15]</sup>。Saleh等<sup>[16]</sup>的研究表明将能够产生GAP的底物添加到牛肉糜中, 能降低样品中高铁肌红蛋白的含量, 但是并未对这种现象进行深入分析。本研究拟采用原位模型及离体模型验证GAPDH催化底物GAP产生的NADH能否直接用于高铁肌红蛋白还原。原位模型中, 向羊肉糜中添加GAPDH的底物GAP, 探究其对肉色稳定性的影响。离体模型中, 将GAPDH、GAP与线粒体和高铁肌红蛋白的溶液共同孵育, 测定高铁肌红蛋白的占比以及在孵育过程中氧气的消耗, 基于此, 确证GAPDH催化底物GAP产生的NADH能否直接被用于高铁肌红蛋白的还原, 明确GAPDH活性调控肉色稳定性的作用途径, 以期调控宰后肉色提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本研究所用材料为小尾寒羊与本地羊的杂交公羊

(8月龄, 未去势), 胴体质量 ( $21.45 \pm 1.23$ ) kg, 采样地点为北京市海淀区阳坊西贯惠茹牛羊肉屠宰厂。

马骨骼肌肌红蛋白 (M0630-250MG)、GAP (G5251-100MG)、GAPDH (G0763)、乙醇脱氢酶 (E1.1.1.1) 美国Sigma公司; SM0020-100T型线粒体提取试剂盒、G1570型詹纳斯绿B染液 (0.2%) 北京索莱宝生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

OXYGRAPH型Clark液相氧电极 汉莎科学仪器有限公司; UV-2401型紫外-可见分光光度计 岛津仪器 (苏州) 有限公司; Minolta CM-400d型色差计 日本大阪柯尼卡美能达传感器股份有限公司; FCR1000-UF-E型除热源型EDI超纯水机 青岛富勒姆科技有限公司; FE-20型实验室pH计 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; HH-4型恒温水浴锅 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司。

### 1.3 方法

本研究分为两部分进行, 第1部分为原位模型, 将GAPDH的底物GAP添加到羊肉糜中, 测定其对肉色稳定性的影响, 并测定NADH含量。第2部分为离体模型, 提取羊心肌线粒体将其作为高铁肌红蛋白还原酶, 将线粒体、GAPDH及其底物GAP等分别与高铁肌红蛋白共同孵育, 在pH 5.6和pH 7.4两个缓冲体系中, 验证GAPDH催化底物GAP产生的NADH能否直接用于高铁肌红蛋白的还原。

#### 1.3.1 原位模型的构建

选取5只饲养环境相同的8月龄小尾寒羊与本地羊杂交公羊, 在宰后30 min取两侧背最长肌, 经4℃成熟24 h后, 剔除筋膜及可见脂肪。将每只羊的背最长肌绞制成肉糜, 并称取100 g三份: 分别添加0.05%、0.01% GAP为T1、T2实验组, 以添加0.05%蒸馏水为对照组 (C)。将称量好的肉糜置于9 cm直径的培养皿中, 肉糜厚度约为1.5 cm。将培养皿放置在4℃冰箱中, 避光。在2 h、1 d、2 d、3 d、4 d、6 d分别测定色差值, 并将测定生化指标的样品采用液氮速冻, 于-80℃冰箱保存。

##### 1.3.1.1 色差值的测定

羊肉色差值采用CIE-L\*a\*b\*法测定, 肉排表面覆盖上透明的PVC膜, 使用便携式色差计测定表面的亮度值

( $L^*$ )、红度值( $a^*$ )、黄度值( $b^*$ )，色差计选择A光源，直径2.54 cm光圈和10°观测器，在使用前用白板进行校准。对每一肉样平行测定5次取平均值。

### 1.3.1.2 NADH含量的测定

NADH的提取参照Klingenberg等<sup>[17]</sup>方法进行。称取2 g羊肉样品添加到16 mL冷的乙醇-KOH溶液中，采用匀浆机在冰上匀浆30 s后，采用振荡器振荡30 s，然后在90 °C的水浴锅中水浴5 min，迅速置于冰浴中5 min。经冰浴冷却的混合物添加约12 mL混合溶液(0.5 mol/L三乙醇胺盐酸盐、0.4 mol/L磷酸二氢钾、0.1 mol/L磷酸氢二钾)并调节pH值至7.8。在室温下静置10 min，使变性的蛋白质沉淀，然后用冷冻高速离心机4 °C、25 000×g离心10 min。

NADH含量的测定参考Kim等<sup>[18]</sup>的方法进行，将0.1 mL提取液添加到反应测定体系中，反应体系：2.5 mL 17.5 μg/mL的二氯酚靛酚溶液，0.5 mL 0.1 mol/L的磷酸钠缓冲液(pH 7.4)，0.5 mL 1 mg/mL的吩嗪硫酸二甲酯溶液，0.1 mL的99%乙醇溶液，0.05 mL乙醇脱氢酶。将反应体系所有的溶液混合后，置于分光光度计反应20 min，每2 min测定600 nm波长处吸光度，然后按照制作的标准曲线计算NADH含量。

### 1.3.2 离体模型的构建

选取3只饲养环境相同的8月龄小尾寒羊与本地羊杂交公羊，在宰后30 min取心脏用于提取线粒体。将得到的线粒体用于离体模型实验，实验组分组如下：高铁肌红蛋白；线粒体+高铁肌红蛋白；氧化型辅酶I(diphosphopyridine nucleotide, NAD)+线粒体+高铁肌红蛋白；GAPDH+GAP+NAD+线粒体+高铁肌红蛋白；GAP+线粒体+高铁肌红蛋白。样品在25 °C孵育3 h，在反应的0、1、2、3 h时取样测定高铁肌红蛋白含量。设置pH 5.6和pH 7.4两组反应体系进行实验，反应体系的配制参考Ramanathan等<sup>[2]</sup>的方法。

#### 1.3.2.1 高铁肌红蛋白溶液的制备

马骨骼肌肌红蛋白溶解到一定体积的磷酸盐缓冲液(2.0 mmol/L, pH 5.5)中，25 °C、10 000×g离心10 min，25 °C自然氧化28 h，用磷酸盐缓冲液(2.0 mmol/L, pH 7.0)将其浓度调到0.75 mmol/L。取少量氧化后的肌红蛋白溶液再稀释5~10倍，测量氧化后溶液中高铁肌红蛋白的相对含量，确认其质量分数大于95%，分装后于-80 °C保存备用。

#### 1.3.2.2 线粒体的提取

采用SM0020-100T型线粒体提取试剂盒进行提取线粒体，按照说明书采用差速离心法提取羊心肌线粒体。将得到的线粒体提取液采用透射电子显微镜和油镜观察。

#### 1.3.2.3 透射电子显微镜染色

先将样品悬浮液滴在干燥的载玻片上，再把带有支持膜的铜网放在悬浮液的液珠上漂浮以沾取样品；然后

用滤纸吸干铜网上的多余悬液，再将铜网在染液滴珠上漂浮，时间1~2 min，最后再用滤纸将染液吸干即可观察。

### 1.3.2.4 詹纳斯绿B染色

取新鲜提取的线粒体与0.5%詹纳斯绿B染色液等量混合，染色2 min，置于油镜下观察。

### 1.3.2.5 氧气消耗率(oxygen consumption rate, OCR)的测定

OCR测定按照高晓光<sup>[19]</sup>的方法进行。样品OCR利用Clark液相氧电极进行测定。氧电极与电脑连接，并使用Oxygraph TM软件采集、分析数据。在25 °C对Oxytherm液相氧电极进行校正，用高浓度、现用现配的连二亚硫酸钠校正零氧基线，然后用去离子水清洗反应室6次以上。再用反应缓冲液冲洗几次，向反应室加入2 mL氧饱和的缓冲液，盖好反应室盖子(保持密闭，以免外界氧气进入反应室)。开启转子，开始记录氧含量，等待2 min使氧含量平稳。取提取的线粒体及反应物质加入反应室，立即计时，记录10 min内的OCR，取平均值。测量温度25 °C。OCR值的计算如公式(1)<sup>[20]</sup>所示：

$$\text{OCR}/(\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})) = \frac{\text{氧气消耗量}/\text{nmol}}{\text{反应时间}/\text{min} \times \text{样品质量}/\text{mg}} \quad (1)$$

### 1.3.2.6 高铁肌红蛋白相对含量的测定

采用分光光度法<sup>[21]</sup>测定孵育体系反应0、1、2、3 h后高铁肌红蛋白相对含量。将反应后的样品采用分光光度计进行扫描，波长分别为503、525、557、582 nm。利用公式(2)计算高铁肌红蛋白的相对含量：

$$\text{高铁肌红蛋白相对含量} = -0.159R_1 - 0.085R_2 + 1.262R_3 - 0.520 \quad (2)$$

$$\text{式中: } R_1 = \frac{A_{582 \text{ nm}}}{A_{525 \text{ nm}}}; R_2 = \frac{A_{557 \text{ nm}}}{A_{525 \text{ nm}}}; R_3 = \frac{A_{503 \text{ nm}}}{A_{525 \text{ nm}}}.$$

## 1.4 数据统计分析

色差值、NADH含量、高铁肌红蛋白相对含量、OCR的数据均采用SPSS 22.0进行统计分析。结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。平均值之间的比较采用ANOVA在0.05水平进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 原位模型中添加GAP对样品理化性质的影响结果

#### 2.1.1 添加GAP对色差值的影响

由表1可知，向羊肉糜中添加GAP能够改善肉色稳定性，提高贮藏期间样品的 $a^*$ (红度值)，GAP添加量0.05%样品的 $a^*$ 值在贮藏期间高于对照组和0.01%样品组，除贮藏的第4天外，0.05% GAP添加组样品 $a^*$ 值显著高于对照组。3组样品 $L^*$ 值在贮藏早期，0.05% GAP添加组最高，随着贮藏时间延长，0.01% GAP添加组样品



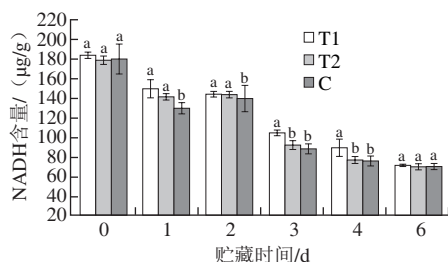
逐渐变高。0.05% GAP添加和对照组样品 $b^*$ 值呈下降趋势,然而在0.01% GAP添加组则呈上升趋势。

表1 GAP对羊肉糜样品色差值的影响  
Table 1 Effect of GAP on color difference of mutton

色差	组别	贮藏时间/d					
		0	1	2	3	4	6
$L^*$	T1	51.36±0.74 <sup>a</sup>	47.741±0.67 <sup>a</sup>	47.19±0.25 <sup>a</sup>	46.48±0.26 <sup>a</sup>	47.01±0.60 <sup>a</sup>	42.74±0.99 <sup>b</sup>
	T2	47.19±0.73 <sup>b</sup>	43.27±0.51 <sup>b</sup>	44.76±0.22 <sup>b</sup>	45.13±0.58 <sup>b</sup>	44.86±0.30 <sup>b</sup>	47.34±0.65 <sup>a</sup>
	C	45.77±0.70 <sup>b</sup>	44.85±0.50 <sup>b</sup>	45.66±0.99 <sup>b</sup>	45.81±0.31 <sup>b</sup>	45.81±0.31 <sup>b</sup>	45.80±0.41 <sup>b</sup>
$a^*$	T1	15.82±0.64 <sup>a</sup>	16.58±0.37 <sup>a</sup>	14.67±0.27 <sup>a</sup>	13.31±0.19 <sup>a</sup>	12.26±0.19 <sup>a</sup>	10.90±0.39 <sup>a</sup>
	T2	14.78±0.48 <sup>b</sup>	15.04±0.24 <sup>b</sup>	13.67±0.18 <sup>b</sup>	11.94±0.48 <sup>b</sup>	10.95±0.35 <sup>b</sup>	9.97±0.23 <sup>b</sup>
	C	14.84±0.28 <sup>b</sup>	15.45±0.31 <sup>b</sup>	13.55±0.32 <sup>b</sup>	12.33±0.22 <sup>b</sup>	12.12±0.14 <sup>b</sup>	8.84±0.17 <sup>c</sup>
$b^*$	T1	6.56±0.34 <sup>a</sup>	8.81±0.28 <sup>a</sup>	8.03±0.29 <sup>a</sup>	8.26±0.16 <sup>a</sup>	8.00±0.19 <sup>a</sup>	5.93±0.52 <sup>b</sup>
	T2	5.43±0.23 <sup>b</sup>	6.45±0.18 <sup>b</sup>	6.95±0.19 <sup>b</sup>	6.42±0.37 <sup>b</sup>	6.30±0.35 <sup>b</sup>	7.61±0.29 <sup>a</sup>
	C	8.77±0.28 <sup>a</sup>	8.46±0.24 <sup>a</sup>	7.85±0.33 <sup>a</sup>	7.69±0.31 <sup>a</sup>	8.00±0.15 <sup>a</sup>	5.91±0.12 <sup>b</sup>

注:同一指标同列不同小写字母表示差异显著,  $P<0.05$ 。

### 2.1.2 添加GAP对NADH含量的影响



同组不同小写字母表示差异显著,  $P<0.05$ 。

图1 样品NADH含量在贮藏期间的变化

Fig. 1 Change in NADH content of mutton sample during storage

由图1可知, 3组样品中的NADH含量随时间的延长呈现降低的趋势, 0.05% GAP添加组样品NADH含量在贮藏的1、2、3、4 d显著高于对照组, 0.01%底物添加组样品在贮藏第2天时显著高于对照组, 其余时间点均差异不显著。说明添加GAP后, 通过样品的GAPDH活性, 催化GAP生成1,3-二磷酸甘油酸, 同时生成了NADH, 从而使该组样品中的NADH含量显著高于对照组。

## 2.2 离体模型中添加GAP对样品生化指标的影响

### 2.2.1 线粒体的形态学观察结果

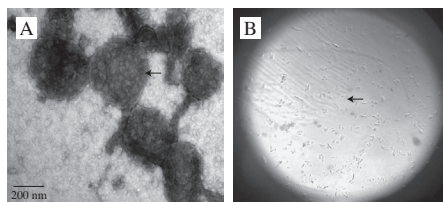
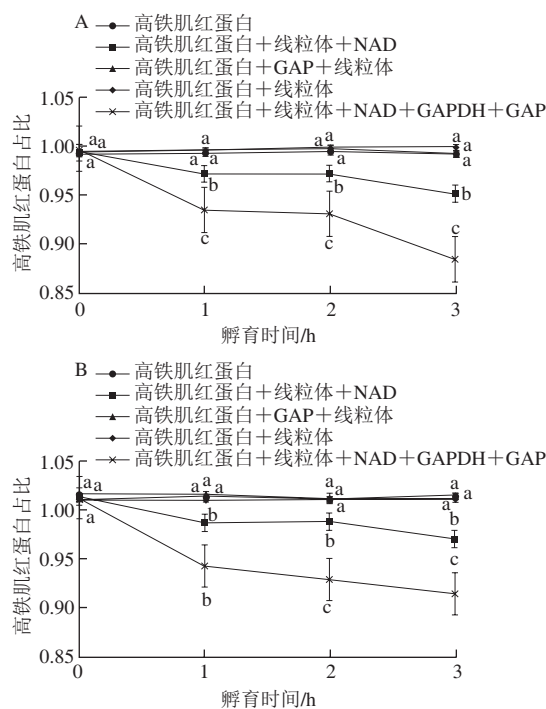


图2 线粒体的形态结构在透射电子显微镜下的结构(A)和油镜下的形态(B)

Fig. 2 Microstructure of mitochondria under transmission electron microscope (A) and morphology under an oil immersion lens (B)

线粒体提取液经负染后, 采用透射电子显微镜进行观察, 如图2所示, 线粒体结构(箭头所示)比较完整, 尤其是膜结构比较明显。线粒体提取液采用詹纳斯绿B染色2 min后, 采用油镜观察, 可以看到视野中有许多的短杆状结构, 说明提取到了线粒体, 而且浓度较高, 采用BSA法测定得到提取的线粒体蛋白质量浓度为2 mg/mL。

### 2.2.2 高铁肌红蛋白相对含量结果



A. pH 5.6; B. pH 7.4。同一时间不同组别不同小写字母表示差异显著,  $P<0.05$ 。下同。

图3 体外添加GAPDH及其底物在不同pH值孵育3 h对高铁肌红蛋白占比的影响

Fig. 3 Effects of GAP and GAP-GAPDH-NAD on mitochondria mediated metmyoglobin reduction after incubation for 3 h at 25 °C at pH 5.6 and 7.4

由图3可知, 高铁肌红蛋白相对含量在高铁肌红蛋白+线粒体+NAD组和高铁肌红蛋白+线粒体+NAD+GAPDH+GAP组均呈显著下降的趋势 ( $P<0.05$ ), 未添加NAD组样品高铁肌红蛋白占比未产生显著变化。在实验期间, pH 7.4的孵育体系的高铁肌红蛋白占比在孵育中低于pH 5.6的孵育体系。这说明添加GAPDH及其底物在体外模型条件下能够起到还原高铁肌红蛋白的作用, 且pH值会影响高铁肌红蛋白的还原, 接近生理pH值条件有利于高铁肌红蛋白的还原。

### 2.2.3 OCR结果

由图4可知, 在体外模型条件下, 各实验组样品均有一定的OCR, 添加了GAPDH和底物GAP组的样品OCR在所有的实验组中最高 ( $P<0.05$ ), 且在pH 7.4时, OCR比pH 5.6时高, 结果表明添加GAPDH及底物GAP

能够增加线粒体的代谢作用,促进NADH的产生,加速线粒体电子链的传递作用,促进高铁肌红蛋白的还原。

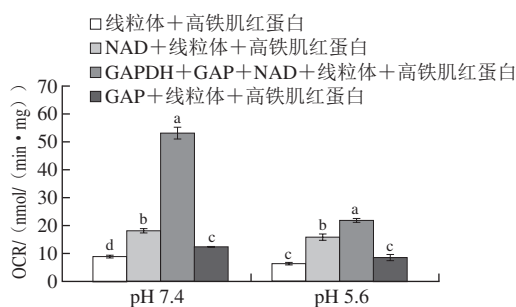


图4 不同处理组样品在25℃环境下pH 7.4和pH 5.6时的OCR

Fig. 4 Oxygen consumption rate of myocardial mitochondria (MT) with either GAP or GAP-GADH-NAD as substrate at pH 5.6 and pH 7.4 at 25℃

### 3 讨论

NADH是高铁肌红蛋白还原酶催化高铁肌红蛋白还原所必需的还原当量<sup>[11,22]</sup>。向羊肉样品中添加GAP会显著提高样品的红度值,这主要是由样品中的GAPDH和高铁肌红蛋白还原酶活性决定的,添加的GAP在样品中GAPDH活性的作用下再生成NADH, NADH在高铁肌红蛋白还原酶的作用下,能够促进高铁肌红蛋白的还原,使肌肉中肌红蛋白保持还原状态,所以其色泽稳定性好<sup>[13,23]</sup>。这与Saleh等<sup>[16]</sup>的研究结果相似,其结果表明向牛肉糜中添加能够生成GAP的底物,牛肉中的高铁肌红蛋白累积速度明显下降,其在实验过程中并没向样品中直接添加GAP,而是向其中添加能够生成GAP的底物,本研究是向样品中直接添加GAP,表明羊肉糜中添加GAP能够显著提高样品的红度值和NADH含量。离体实验中,添加GAPDH和GAP组及NAD组样品的高铁肌红蛋白占比显著低于另外实验组样品,离体实验结果表明GAPDH催化GAP产生的NADH能够用于高铁肌红蛋白的还原,这与原位模型的结果相符合,原位模型的结果显示添加GAP会升高羊肉样品的红度值。

NADH被用于高铁肌红蛋白还原时,需要线粒体上的高铁肌红蛋白还原酶发挥作用<sup>[24-25]</sup>,而且线粒体的电子传递链要保持完整,在此过程中会增加氧气的消耗<sup>[22,26-27]</sup>。添加GAPDH和GAP组及NAD组样品的OCR高于其他组样品,是该两组样品中的NADH含量较高,高铁肌红蛋白还原活动比较剧烈的一个有力证据。

高铁肌红蛋白的还原在pH 5.6的缓冲体系中低于pH 7.4,并且OCR也低,这与Ramanathan等<sup>[27]</sup>的研究结果相似,接近于生理的pH值更有利于GAPDH催化底物产生NADH和高铁肌红蛋白还原酶发挥活性。偏酸性环境会加速肌红蛋白的氧化,这主要是由于在酸性环境中肌红蛋白的自氧化作用比较活跃<sup>[22,28-30]</sup>。

### 4 结论

本研究通过原位模型结合离体模型证实,向宰后羊肉中添加GAP能够提高样品的色泽稳定性,这主要是由于在GAPDH催化下生成的NADH能够被用于高铁肌红蛋白的还原,降低了高铁肌红蛋白的占比。离体模型进一步证实, GAPDH催化GAP产生的NADH能够降低高铁肌红蛋白的占比,会增加OCR。因此, GAPDH通过催化底物GAP产生NADH作用于高铁肌红蛋白的还原影响肉色稳定性。

### 参考文献:

- [1] 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. DOI:10.1021/jf061225h.
- [2] RAMANATHAN R, MANCINI R A, JOSEPH P, et al. Effects of lactate on ground lamb color stability and mitochondria-mediated metmyoglobin reduction[J]. Food Chemistry, 2011, 126(1): 166-171. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.10.093.
- [3] MANCINI R A, HUNT M C. Current research in meat color[J]. Meat Science, 2005, 71(1): 100-121. DOI:10.1016/j.meatsci.2005.03.003.
- [4] SUMAN S P, JOSEPH P. Myoglobin chemistry and meat color[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2013, 4: 79-99. DOI:10.1146/annurev-food-030212-182623.
- [5] CANTO A C, COSTA-LIMA B R, SUMAN S P, et al. Color attributes and oxidative stability of *longissimus lumborum* and *psaos major* muscles from Nellore bulls[J]. Meat Science, 2016, 121: 19-26. DOI:10.1016/j.meatsci.2016.05.015.
- [6] LEDWARD D A. Post-slaughter influences on the formation of metmyoglobin in beef muscles[J]. Meat Science, 1985, 15(3): 149-171. DOI:10.1016/0309-1740(85)90034-8.
- [7] KIM Y H. Lactate Dehydrogenase regulation of the metmyoglobin reducing system to improve color stability of bovine muscles through lactate enhancement[D]. Calgary: Texas A&M University, 2008.
- [8] TANG J L, FAUSMAN 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. DOI:10.1021/jf050092h.
- [9] SUMAN S P, HUNT M C, NAIR M N, et al. Improving beef color stability: practical strategies and underlying mechanisms[J]. Meat Science, 2014, 98(3): 490-504. DOI:10.1016/j.meatsci.2014.06.032.
- [10] YI G, GRABEŽ V, BJELANOVIC M, et al. Lipid oxidation in minced beef meat with added Krebs cycle substrates to stabilise colour[J]. Food Chemistry, 2015, 187: 563-571. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.04.002.
- [11] KIM Y H, KEETON J T, HUNT M C, et al. Effects of L- or D-lactate-enhancement on the internal cooked colour development and biochemical characteristics of beef steaks in high-oxygen modified atmosphere[J]. Food Chemistry, 2010, 119(3): 918-922. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.07.054.
- [12] ZHU J, LIU F, LI X, et al. Effect of succinate sodium on the metmyoglobin reduction and color stability of beef patties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(13): 5976-5981. DOI:10.1021/jf900958p.

- [13] RAMANATHAN R, MANCINI R A, VAN BUITEN C B, et al. Effects of pyruvate on lipid oxidation and ground beef color[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(8): 886-892. DOI:10.1111/j.1750-3841.2012.02814.x.
- [14] WANG C C, HAN C Z, LI T, et al. Nuclear translocation and accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase involved in diclazuril-induced apoptosis in *Eimeria tenella* (*E. tenella*)[J]. Veterinary Research, 2013, 44(29): 1-9. DOI:10.1186/1297-9716-44-29.
- [15] SANGOLGI P B, BALAJI C, DUTTA S, et al. Cloning, expression, purification and characterization of *Plasmodium* spp. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 117(7): 17-25. DOI:10.1016/j.pep.2015.08.028.
- [16] SALEH B, WATTS B M. Substrates and intermediates in the enzymatic reduction of metmyoglobin in ground beef[J]. Journal of Food Science, 1968, 33(4): 353-358. DOI:10.1111/j.1365-2621.1968.tb03629.x.
- [17] KLINGENBERG M. Nicotinamide-adenine dinucleotides (NAD, NADP, NADH, NADPH) spectrophotometric and fluorimetric methods: methods of enzymatic analysis[M]. 2nd ed. London: Academic Press, 1974: 2045-2072.
- [18] KIM Y H, KEETON J T, YANG H S, et al. Color stability and biochemical characteristics of bovine muscles when enhanced with *L*- or *D*-potassium lactate in high-oxygen modified atmospheres[J]. Meat Science, 2009, 82(2): 234-240. DOI:10.1016/j.meatsci.2009.01.016.
- [19] 高晓光. 羊肉色泽影响因素及色泽相关蛋白质组分分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [20] ESTABROOK R W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios[J]. Methods Enzymol, 1967, 10(3): 41-47. DOI:10.1016/0076-6879(67)10010-4.
- [21] TANG J L, FAUSTMAN C, HOAGLAND T A. Krzywicki revisited: equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extracts[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(9): 717-720. DOI:10.1111/j.1365-2621.2004.tb09922.x.
- [22] HUNT M C, KING A. AMSA meat color measurement guidelines[M]. 2nd ed. Champaign, Illinois USA: American Meat Science Association, 2012.
- [23] BELSKIE K M, VAN BUITEN C B, RAMANATHAN R, et al. Reverse electron transport effects on NADH formation and metmyoglobin reduction[J]. Meat Science, 2015, 105: 89-92. DOI:10.1016/j.meatsci.2015.02.012.
- [24] BEKHIT A E, FAUSTMAN C. Metmyoglobin reducing activity[J]. Meat Science, 2005, 71(3): 407-439. DOI:10.1016/j.meatsci.2005.04.032.
- [25] MIKKELSEN A, JUNCHER D, SKIBSTED L H. Metmyoglobin reductase activity in porcine *M. longissimus* dorsi muscle[J]. Meat Science, 1999, 51(2): 155-161. DOI:10.1016/S0309-1740(98)00114-4.
- [26] GAO X G, WANG Z Y, TANG M T, 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. DOI:10.1016/s2095-3119(14)60754-1.
- [27] 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. DOI:10.1016/j.meatsci.2012.12.005.
- [28] SHIKAMAK, SUGAWARA Y. Autoxidation of native oxymyoglobin. Kinetic analysis of the pH profile[J]. European Journal of Biochemistry, 1978, 91(2): 407-413.
- [29] RICHARDS M P. Redox reactions of myoglobin[J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2013, 18(17): 2342-2351. DOI:10.1089/ars.2012.4887.
- [30] MEICHINYIN, FAUSTMAN C. Influence of temperature, pH, and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid A liposome model[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41(6): 853-857. DOI:10.1021/jf00030a002.