

孙 冲,王道营,张牧烺,等. 氧合肌红蛋白的制备及其稳定性[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):360-362.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.104

氧合肌红蛋白的制备及其稳定性

孙 冲¹,王道营¹,张牧烺¹,张 森²,卞 欢¹,吴海虹¹,诸永志¹,耿志明¹,徐为民¹

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014; 2. 南京财经大学食品科学与工程学院,江苏南京 210046)

摘要:为了分析氧合肌红蛋白(OxyMb)的稳定性,分别采用紫外分光光度法、圆二色谱法研究在不同温度(20~60℃)、pH值(3.0~11.0)、盐浓度(1%~5%)条件下OxyMb的蛋白结构及稳定性。结果表明:随着温度的升高,OxyMb稳定性减弱;当温度高于40℃后,OxyMb的结构发生很大变化,氧化显著加剧;OxyMb在中性环境下的氧化还原稳定性最高,同时OxyMb在偏碱性环境中的氧化还原稳定性比偏酸性条件中的高;在盐浓度不太高的范围内(1%~5%),盐浓度高低对OxyMb的自动氧化没有明显影响。

关键词:氧合肌红蛋白(OxyMb);稳定性;紫外分光光度法;圆二色谱法

中图分类号: S185;TS251.5⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0360-03

肌红蛋白(myoglobin, Mb)是存在于动物肌肉组织细胞中储存氧、分配氧的色素蛋白质,由1条多肽链构成的珠蛋白(globin)、1个血红素辅基(1个卟啉环与Fe的络合物)构成。Mb的含量依赖于动物的种类、性别、年龄、营养状况、肌肉活动、氧气消耗率、血液循环、肌肉类型及肉的处理方式等^[1]。在放血充分的肌肉中,Mb是色素物质的主要成分,它与肉类颜色的深浅呈正相关,因此Mb的稳定性也会影响肉色的稳定性^[2-3]。肌肉中的Mb主要以氧合肌红蛋白(OxyMb)的形式存在,研究表明,许多因素会影响OxyMb的氧化,主要包括温度、高铁肌红蛋白(MetMb)还原系统活性、氧分压以及脂质氧化。高温、低pH值以及非血红素铁的存在会使OxyMb更易氧化。活体内存在的MetMb还原系统可分为酶系、非酶系,它能维持肌肉中的还原状态,并能将MetMb还原成OxyMb,使肌肉中MetMb的水平维持在2%~3%左右。宰后肉中的OxyMb逐渐发生自动氧化转变为MetMb,血红素铁被氧化,肉色发生褐变^[4]。良好、正常的肉色能很好地激起消费者的购买欲望,从而较好地促进销售;相反,货架期内的变色会给肉及肉制品市场带来不可低估的负面影响。

相关研究表明,Mb氧化过程能促进脂质氧化,这一过程受很多因素影响,包括pH值、MetMb含量、血红素的结合力、铁离子的游离程度等,同时一些脂质氧化产物也能加速进肌肉中Mb的氧化和劣变^[5-8]。本研究以猪肉糜中提取所得Mb为研究对象,并将其制备成OxyMb,研究离体条件下不同pH值、温度、盐度对OxyMb稳定性的影响,确定影响肉色稳定的外界因素以及稳定肉色的措施,以期改善肉色稳定性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜猪肉购自当地农贸市场。无水乙醇、Tris、盐酸、硫酸铵、连二亚硫酸钠、磷酸二氢钾等均为国产分析纯。主要仪器设备有M124A万分之一分析天平、T18型高速匀浆机、UV-6100分光光度计、圆二色谱仪、K3冷冻离心机、HH-4数显恒温水浴锅、DGC-9023A型电热恒温鼓风干燥箱、KQ-300GVDV型三频恒温数控超声波清洗器。

1.2 试验方法

1.2.1 肌红蛋白的提取 肌红蛋白的提取参考相关文献并适当改进^[9-10]。取100g肉糜与300mL预冷的萃取介质(10mmol/L Tris-HCl, pH值=8.5)混匀,13000r/min匀浆2min;然后在4℃条件下于10000×g离心15min,吸出上清液,置于65%饱和度的硫酸铵中盐析1h;上清液于10000g离心15min,取粉红色的滤液,于-20℃储存待用。

1.2.2 OxyMb的制备和表征 利用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度后,调整浓度至2mg/mL,立即使用。取5mL Mb、50mg连二亚硫酸钠反应即得氧合肌红蛋白(OxyMb)。样品中多余的连二亚硫酸钠可通过10倍体积预冷的50mmol/L磷酸盐缓冲液(pH值=7.0)透析除去,透析液换20次。将透析后的OxyMb浓度调至0.2mg/mL。总肌红蛋白含量、OxyMb的含量根据Krzewicki的方法^[11]计算,具体公式如下:

$$T_{Mb} = -0.166D_{572\text{ nm}} + 0.086D_{565\text{ nm}} + 0.088D_{545\text{ nm}} + 0.099D_{525\text{ nm}}; \quad (1)$$

$$\text{OxyMb 含量} = (0.882R_1 - 1.267R_2 + 0.809R_3 - 0.361) \times 100\%; \quad (2)$$

$$\text{MetMb 含量} = (-2.514R_1 + 0.777R_2 + 0.800R_3 + 1.098) \times 100\%. \quad (3)$$

式中: T_{Mb} 为总肌红蛋白含量,mg/g; R_1 、 R_2 、 R_3 分别为 $D_{572\text{ nm}}$ / $D_{525\text{ nm}}$ 值、 $D_{565\text{ nm}}$ / $D_{525\text{ nm}}$ 值、 $D_{545\text{ nm}}$ / $D_{525\text{ nm}}$ 值。

以50mmol/L、pH值=7.0的磷酸盐缓冲液作对照,将提取的Mb、OxyMb溶液分别在350~700nm波长处用紫外分光光度计扫描。蛋白结构采用圆二色谱仪进行表征,圆二色谱

收稿日期:2016-02-18

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31571863);江苏省农业科学院基本科研业务专项[编号:ZX(15)4004]。

作者简介:孙 冲(1981—),女,江苏建湖人,博士,助理研究员,研究方向为肉品科学。E-mail:sunchong0106@163.com。

通信作者:王道营,博士,副研究员,研究方向为肉品加工与质量控制。E-mail:wdy0373@aliyun.com。

仪测试参数:参比溶液为 PBS,石英比色皿厚度为 1 mm,扫描范围 180 ~ 320 nm,步阶为 1.0 nm。

1.2.3 温度对 OxyMb 稳定性的影响 取 3 mL 制备的 OxyMb 溶液(pH 值=7.0)分别置于 20、30、40、50、60 °C 水浴中加热 10 min,然后将样品取出迅速浸入冰中,防止温度继续上升。再于 4 000 r/min 离心 5 min 后立即用紫外分光光度计分别扫描 350 ~ 700 nm 波长下的光谱,根据上述 Krzywicki 公式计算 MetMb 含量。蛋白结构采用圆二色谱仪进行表征。

1.2.4 pH 值对 OxyMb 稳定性的影响 OxyMb 溶液用 10 倍体积,pH 值分别为 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 预冷 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液透析 15 h,再于 4 000 r/min 离心 5 min。所有的操作均在 4 °C 条件下进行。取 5 种 pH 值的溶液,分别用紫外分光光度计扫描 350 ~ 700 nm 波长下的光谱,根据上述 Krzywicki 公式计算 MetMb 含量。采用圆二色谱仪对蛋白结构进行表征。

1.2.5 盐度对 OxyMb 稳定性的影响 在 OxyMb 溶液中分别加入 1%、2%、3%、4%、5% 氯化钠,再于 4 000 r/min 离心 5 min。所有操作均在 4 °C 条件下进行。取 5 种不同盐浓度的溶液,分别用紫外分光光度计扫描 350 ~ 700 nm 波长下的光谱,根据上述 Krzywicki 公式计算 MetMb 含量。蛋白结构采用圆二色谱仪进行表征。

2 结果与分析

2.1 Mb 的提取、OxyMb 的制备和表征

肉糜中提取的 Mb 粗提液经 65% 硫酸铵沉淀后,得到红褐色溶液,进一步制备得到 OxyMb。图 1 显示,Mb 在 412、541、574 nm 处有吸收峰,OxyMb 溶液在 407、538、568 nm 处有吸收峰^[12]。圆二色谱可以用来研究 Mb、OxyMb 蛋白结构的变化情况。由图 2 可见,Mb 在 228 nm 处有 1 个负峰;当加入连二亚硫酸钠制备 OxyMb,在 234 nm 处出现 1 个负峰。结合光谱结果可知,OxyMb 已经成功制备,蛋白结构没有发生较大改变。

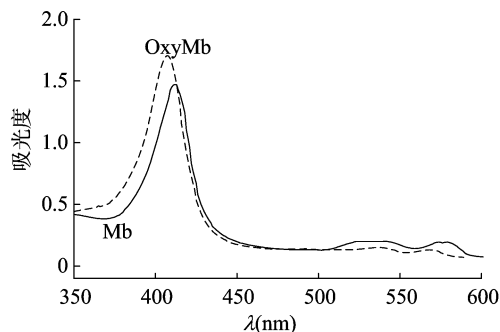
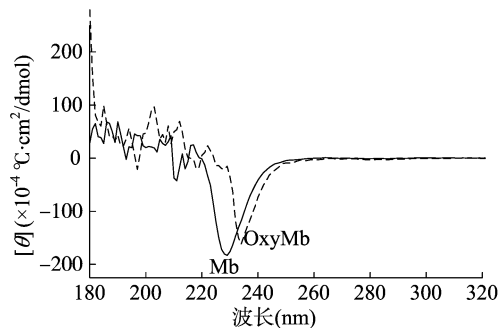


图1 Mb、OxyMb 的紫外光谱

2.2 温度对 OxyMb 稳定性的影响

温度对 OxyMb 稳定性的影响通过紫外扫描光谱及圆二色谱可表征。由图 3、图 4 可知:当温度为 20、30、40 °C 时,OxyMb 的紫外吸收光谱及圆二色谱图均表明其结构性变化不大,但是含量逐渐降低;同时通过计算可知,高铁肌红蛋白的生成量在 20、30、40 °C 分别为 $(33.92 \pm 0.012)\%$ 、 $(37.99 \pm 0.015)\%$ 、 $(43.86 \pm 0.013)\%$,逐渐提高;但在 50 ~ 60 °C 时,OxyMb 在 350 ~ 450 nm 的峰形及吸光度明显降低,



[θ]表示椭圆率。图4、图6、图8同

图2 Mb、OxyMb 远紫外 CD 谱

圆二色谱显示其特征吸收峰极大减弱,表明 OxyMb 的结构发生很大变化,蛋白变性加剧;同时通过计算高铁肌红蛋白的含量[50、60 °C 分别为 $(61.34 \pm 0.015)\%$ 、 $(66.12 \pm 0.017)\%$]可知,含量明显增大。这些结果是由于肌红蛋白的热稳定性受其结构影响所造成的^[12-15]。

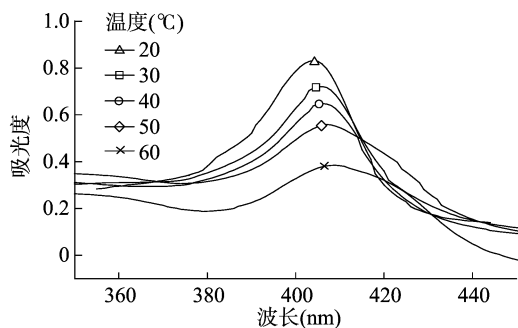


图3 不同温度下 OxyMb 的紫外光谱

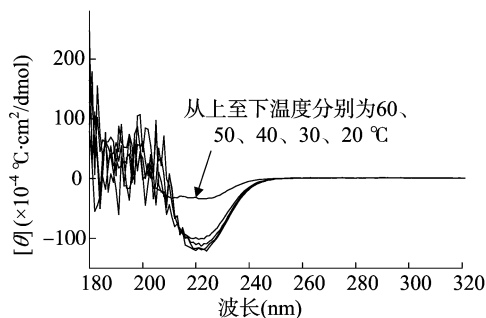


图4 不同温度下 OxyMb 的远紫外 CD 谱

2.3 pH 值对 OxyMb 稳定性的影响

由图 5、图 6 可见不同 pH 值下 OxyMb 稳定性的变化。OxyMb 特征吸收峰由大到小排序为 pH 值 = 7.0 > pH 值 = 9.0 > pH 值 = 11.0 > pH 值 = 5.0,表明 OxyMb 在中性溶液中稳定性最高,偏碱性环境稳定性较偏酸性环境高。但是在 pH 值 = 3 的溶液中,OxyMb 沉淀完全,说明在极酸性的环境中血红素和球蛋白之间的共价键被破坏^[16-17]。这些结果可能是由于在中性环境下,OxyMb 的空间结构没有被破坏,而碱性条件下血红素解离,OxyMb 结构发生改变。

2.4 盐度对 OxyMb 稳定性的影响

在制备好的 OxyMb 溶液中分别加入不同 NaCl,使其盐浓度分别为 1%、2%、3%、4%、5%。由图 7、图 8 可以看出:低盐度的溶液中(1%)稳定性最高;2% ~ 5% 盐浓度下,OxyMb 特征吸收峰相差不大;通过计算可知,不同盐浓度对应高铁

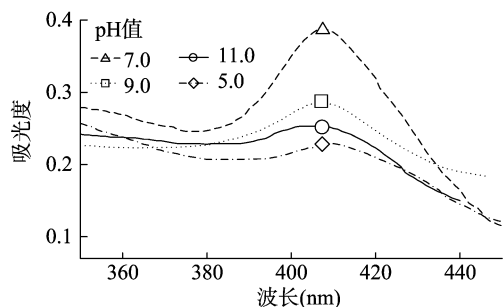


图5 不同pH值下 OxyMb 紫外光谱

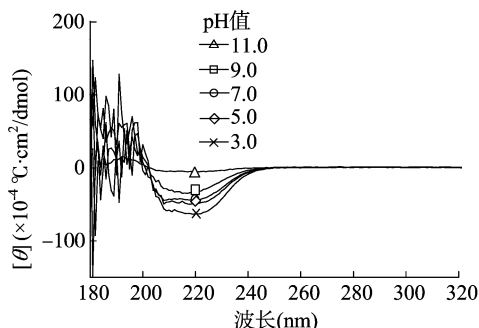


图6 不同pH值下 OxyMb 远紫外 CD 谱

肌红蛋白的生成量[1%、2%、3%、4%、5%盐浓度分别为(20.19±0.01)%、(21.36±0.012)%、(22.64±0.011)%、(24.0±0.0095)%、(25.09±0.014)%]也没有明显差异,说明 OxyMb 受盐浓度的影响不大。

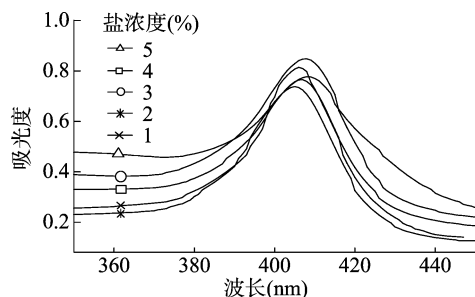


图7 不同盐浓度下 OxyMb 的紫外光谱

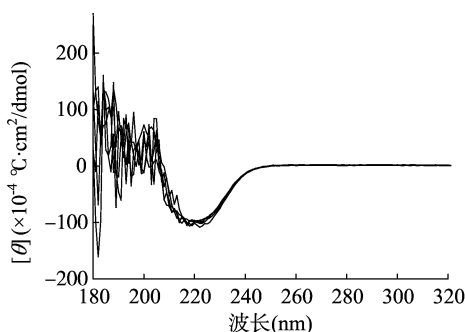


图8 不同盐浓度下 OxyMb 的远紫外 CD 谱

3 结论

研究表明,随着温度的升高,OxyMb 稳定性减弱;当温度高于 40℃后,OxyMb 的结构发生很大变化,氧化显著加剧。可见 OxyMb 在中性环境下氧化还原稳定性最高;同时,

OxyMb 在偏碱性的环境中比偏酸性条件下的氧化稳定性要高;在盐浓度不太高的范围内(1%~5%),盐浓度的高低对 OxyMb 的自动氧化没有明显影响。

参考文献:

- [1] Perutz M F. Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide [J]. Annual Review of Physiology, 1990, 52(1): 1-25.
- [2] Mancini R A, Hunt M C. Current research in meat color [J]. Meat Science, 2005, 71(1): 100-121.
- [3] Bekhit A E, Faustman C. Metmyoglobin reducing activity [J]. Meat Science, 2005, 71(3): 407-439.
- [4] Maqsood S, Benjakul S. Comparative studies on molecular changes and pro-oxidative activity of haemoglobin from different fish species as influenced by pH [J]. Food Chemistry, 2011, 124(3): 875-883.
- [5] Sohn J H, Taki Y, Ushio H, et al. Lipid oxidations in ordinary and dark muscles of fish: influences on rancid off-odor development and color darkening of yellowtail fresh during ice storage [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(7): 490-496.
- [6] Rawdkuen S, Jongjareonrak A, Benjakul S, et al. Discoloration and lipid deterioration of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscle during refrigerated storage [J]. Journal of Food Science, 2008, 73(3): C179-C184.
- [7] Lee S, Phillips A L, Liebler D C, et al. Porcine oxymyoglobin and lipid oxidation *in vitro* [J]. Meat Science, 2003, 63(2): 241-247.
- [8] Lee B J, Hendricks D G, Cornforth D P. A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef pattie model system [J]. Meat Science, 1999, 51(3): 245-253.
- [9] Trout G R, Gutzke D A. A simple, rapid preparative method for isolating and purifying oxymyoglobin [J]. Meat Science, 1996, 43(1): 1-13.
- [10] 陈景宜, 牛力, 黄明, 等. 牛心氧合肌红蛋白的分离纯化及氧化稳定性研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(13): 1-5.
- [11] Krzywicki K. The determination of haem pigments in meat [J]. Meat Science, 1982, 7(7): 29-36.
- [12] 林森森, 廖明涛, 刘书臣, 等. 鲤鱼 4℃贮藏期间色素物质及脂质氧化的变化 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(7): 87-94.
- [13] Ueki N, Chow C J, Ochiai Y. Characterization of bullet tuna myoglobin with reference to thermostability-structure relationship [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(12): 4968-4975.
- [14] Ueki N, Ochiai Y. Primary structure and thermostability of bigeye tuna myoglobin in relation to those of other scombridae fish [J]. Fisheries Science, 2004, 70(5): 875-884.
- [15] Ueki N, Ochiai Y. Effect of amino acid replacements on the structural stability of fish myoglobin [J]. Journal of Biochemistry, 2006, 140(5): 649-656.
- [16] Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W A. Characterisation of myoglobin from sardine (*Sardinella gibbosa*) dark muscle [J]. Food Chemistry, 2007, 100(1): 156-164.
- [17] Renner M, Anton M, Gatellier P. Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles [J]. Meat Science, 1992, 32(3): 331-342.