

刘 越, 孙 冲, 李鹏鹏, 等. 高效液相色谱分析内源性物质对血红素辅基稳定性的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1164-1170.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.031

高效液相色谱分析内源性物质对血红素辅基稳定性的影响

刘 越^{1,2}, 孙 冲¹, 李鹏鹏¹, 张新笑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.南京农业大学, 江苏 南京 210095)

摘要: 通过高效液相色谱分析肉品中内源性物质(乳酸、金属离子和脂肪酸)对肌红蛋白血红素辅基的影响。乳酸处理时间分别为1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h, 金属离子(CuCl_2 、 FeCl_2 、 MgCl_2 、 MnSO_4)设7个浓度梯度, 依次为0 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$, 脂肪酸则选择肉品中常见的油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸和肉豆蔻酸。液相数据分析结果表明, 随着乳酸作用时间的延长, 其对肌红蛋白血红素辅基的破坏作用逐渐增强。随着金属离子浓度的不断增大, 血红素辅基的稳定性表现不一, 其中 Cu^{2+} 会降低其稳定性, Fe^{2+} 在一定程度上会增加其稳定性, 而 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对其作用不明显。脂肪酸会加快肌红蛋白血红素的降解, 其中不饱和度高的脂肪酸造成肌红蛋白血红素的损失更大。

关键词: 高效液相色谱; 肌红蛋白; 血红素辅基; 乳酸; 金属离子; 脂肪酸

中图分类号: S823.9⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)05-1164-07

Influence of endogenous substances on the stability of heme prosthetic group detected by high performance liquid chromatography

LIU Yue^{1,2}, SUN Chong¹, LI Peng-peng¹, ZHANG Xin-xiao¹, XU Wei-min¹

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The effects of lactic acid, metal ions and fatty acids on heme prosthetic group of myoglobin were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The myoglobin was treated with lactic acid for 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h and 6 h, respectively, and the concentrations of metal ions (CuCl_2 , FeCl_2 , MgCl_2 , MnSO_4) were set as 0 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 60 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, palmitic acid and myristic acid were selected as fatty acids to explore the stability of heme prosthetic group of myoglobin. The HPLC results revealed that the peak area of heme prosthetic group of myoglobin gradually decreased over the time of lactic acid treatment. As the metal ion concentration went up, the stability of heme prosthetic group varied. Cu^{2+}

decreased its stability, while Fe^{2+} increased. Mg^{2+} and Mn^{2+} did not show obvious effects. Oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, palmitic acid and myristic acid could accelerate the degradation of heme prosthetic group, and the higher the degree of unsaturation, the greater the loss.

Key words: high performance liquid chromatography; myoglobin; heme prosthetic group; lactic acid; metal ion; fatty acid

收稿日期: 2017-03-29

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31601405); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20160591); 江苏省农业科学院院基金项目(6111681)

作者简介: 刘 越(1992-), 男, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 主要从事肉品科学研究。(Tel) 18801588572; (E-mail) 362308393@qq.com

通讯作者: 徐为民, (Tel) 13851577250; (E-mail) weiminxu2002@aliyun.com

肉品的感官品质主要包括色泽、嫩度和风味等几个方面,首先影响消费者感官的指标是色泽^[1]。肉品的色泽主要由血红蛋白和肌红蛋白决定,而在实际生活中,消费者所购买的肉都是经过放血的,所以销售肉品的颜色主要由肌红蛋白决定^[2]。肌红蛋白是用来储存氧和分配氧的色素蛋白质,存在于动物肌肉组织细胞中,由1条多肽链构成的珠蛋白和1个血红素辅基组成。肌红蛋白的二级结构主要为 α -螺旋,其多肽链由长短不等的8段 α -螺旋组成^[3]。肌红蛋白本身是紫红色,在空气中与氧结合形成氧合肌红蛋白呈鲜红色,继续被氧化生成高铁肌红蛋白呈褐色,即使在冷藏期间,颜色也会随时间变化而发生改变^[4-5]。肌红蛋白从紫色转变为鲜红色较容易,从鲜红色转变为褐色则需要较长时间^[6]。血红素辅基是卟啉与铁离子或亚铁离子结合形成的复合物^[7],对于不同类别的肌红蛋白,其珠蛋白和血红素辅基间的结合方式大多是非共价键方式,主要包括配位键作用、疏水相互作用、范德华力作用和氢键作用等^[8]。

被宰后的动物体内存在着一定浓度的乳酸,在宰后成熟期间,由于氧气供应中断,肌肉糖原先水解成葡萄糖,再经过无氧酵解生成乳酸,使乳酸不断积累^[9]。动物体内存在多种金属离子,被宰后动物肌肉中这些金属离子依然存在,且存在大量脂肪酸,这些脂肪酸在空气中易被氧化^[10]。以往研究大多是关于外源性条件(pH、盐度、保存温度和时间等)改变对肌红蛋白稳定性的影响,随着肉品贮藏条件的变化,内源性物质对肉品品质也有影响,其作用途径和作用方式是研究的热点。目前,关于肉品中肌红蛋白受内源性物质影响的研究较少,而关于血红素辅基与内源性物质关系的报道更是少之又少。

以往对肌红蛋白和血红素辅基的研究大多采用紫外光谱法^[11],由于血红蛋白与肌红蛋白结构非常相似,因而该方法在抗干扰以及提高蛋白质定量的准确度等方面存在一定的缺陷。本研究拟采用高效液相色谱法探究内源性物质对肌红蛋白血红素辅基的影响,精确分析内源性物质对血红素辅基的影响程度,深入了解影响肌红蛋白结构稳定性的关键因素,以期将来控制肌红蛋白血红素辅基结构的变化和稳定肉色提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

新鲜牛肉购自江苏省南京市下马坊苏果社区店,肌红蛋白标准品(马骨骼肌红蛋白)、油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸、肉豆蔻酸购自美国 Sigma 公司,其他试剂均为分析纯,所有溶液均用超纯水配制。

WH2 微型旋涡混合仪购自上海沪西分析仪器有限公司,M124A 万分之一分析天平购自意大利 BEL 公司,HH8 数显恒温水浴锅购自国华电器有限公司,FE20 实验室 pH 计购自梅特勒-托利多仪器上海有限公司,UPC10AKTA 蛋白纯化仪购自美国 GE 公司,N-EVAP 氮吹仪购自美国 Organomation 公司,SPX250C 恒温培养箱购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂,Waters2695 高效液相色谱仪购自美国 Waters 公司,AgilentZX26 液相色谱串联飞行时间质谱仪购自美国 Agilent Technologie 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 肌红蛋白的提取与纯化 牛肉肌红蛋白的提取方法参考 Thiansilakul 法^[12]并加以修改。

1.2.1.1 粗提物的提取 取 100 g 肉糜与 300 ml 冷的萃取介质(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8)混匀,10 000 r/min 匀浆 1 min,然后以 9 600 g 的转速离心 15 min,吸出上清液用 75% 饱和度的硫酸铵盐析 1 h,上清液 10 000 r/min 离心 30 min,取粉红色上清液,将盐析的蛋白质上清液(截留分子量 7 000)置于透析袋中,通过 10 倍体积冷的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8)透析除去硫酸铵,透析袋放到冷冻恒温摇床中,转速为 100 r/min,透析液换 10 次,即得到肌红蛋白的粗提物,所有的提取过程均在 4 ℃ 条件下进行。

1.2.1.2 蛋白层析分离纯化 肌红蛋白纯化用的层析柱为 Sephadex G200 凝胶柱,进样前先用冷的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8)平衡凝胶柱,将透析后的肌红蛋白经 0.2 μ m 的滤孔过滤后进样,每次上样 1 ml,流速为 1 ml/min,紫外检测波长为 280 nm,收集出峰位置处的溶液于 10 ml EP 管中,4 ℃ 保存。

1.2.1.3 SDS-PAGE 电泳分析 SDS-PAGE 电泳前样品处理:0.2 ml 除盐后的纯化蛋白液中加入 0.4 ml 上样缓冲液,95 ℃ 处理 5 min。SDS-PAGE 电泳采用 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,每孔等体积上

样 20 μl , 电泳电压 160 V 持续 50~60 min, 凝胶块用考马斯亮蓝染色液染色 10 min 后取出, 加入适量的脱色液, 放在摇床上使脱色更为均匀迅速, 1 h 后更换脱色液, 直至脱色完成, 取出凝胶块用凝胶成像仪进行成像分析。

1.2.2 液相收集与质谱分析 分别收集反相高效液相色谱出峰位置处的液体, 随后利用 SPE 柱对收集液进行净化浓缩, 用氮气将乙腈吹干, 然后用少量双蒸水溶解管壁内的溶质, 最后用液相色谱串联飞行时间质谱进行质谱分析。离子源: 电喷雾源 (ESI), 正离子模式。离子化条件: 气温和流速分别为 300 $^{\circ}\text{C}$ 、3 $\mu\text{l}/\text{min}$, 针泵直径 2.3 mm, 毛细管电压 5.5 kV, 采集时间 0.5 s, 雾化器 GS1 和辅助加热器 GS2 的压力为 30 Psi。数据通过分析软件 Peakview 进行定性分析。

1.2.3 液相色谱分析

1.2.3.1 色谱条件 色谱柱: C18 反相色谱柱, 流动相: A 为 0.1% TFA 水溶液, B 为 0.1% TFA-乙腈, 流速: 1 ml/min, 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$, 波长: 210~410 nm, 洗脱梯度: 0~10 min, 流动相由 5% B 和 95% A 逐渐转变为 60% B 和 40% A; 10~20 min, 流动相为 60% B 和 40% A; 20~25 min, 流动相由 60% B 和 40% A 逐渐转变为 5% B 和 95% A。

1.2.3.2 乳酸对肌红蛋白血红素辅基的影响 制备质量浓度为 0.2 mg/ml 的肌红蛋白溶液, 加入一定量的乳酸使乳酸浓度达到 100 mmol/L, 对照组采用等体积的双蒸水替代乳酸, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化, 孵化时间分别为 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h, 分别进行液相分析。

1.2.3.3 金属离子对肌红蛋白血红素辅基的影响 Cu^{2+} : 制备肌红蛋白质量浓度为 0.2 mg/ml 和抗坏血酸浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的样品, 分别加入 Cu^{2+} (pH 7, 3 ml) 后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 100 min, Cu^{2+} 浓度分别为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 分别进行液相分析。 Fe^{2+} : 制备肌红蛋白质量浓度为 0.2 mg/ml 和抗坏血酸浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的样品, 分别加入 Fe^{2+} (pH 7, 3 ml) 后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 100 min, Fe^{2+} 浓度分别为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 分别进行液相分析。 Mg^{2+} : 制备肌红蛋白质量浓度为 0.2 mg/ml 和抗坏血酸浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的样品, 分别加入 Mg^{2+} (pH 7, 3 ml) 后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 100 min, Mg^{2+} 浓度分别为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、20

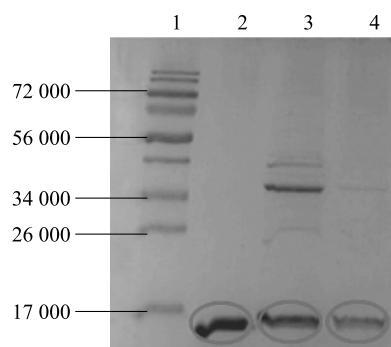
$\mu\text{mol}/\text{L}$ 、40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 分别进行液相分析。 Mn^{2+} : 制备肌红蛋白质量浓度为 0.2 mg/ml 和抗坏血酸浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的样品, 分别加入 Mn^{2+} (pH 7, 3 ml) 后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 100 min, Mn^{2+} 浓度分别为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 分别进行液相分析。

1.2.3.4 脂肪酸对肌红蛋白血红素辅基的影响 分别将 5 μl 油酸、5 μl 亚油酸、5 μl 亚麻酸、5 μl 棕榈油酸和 5 μl 肉豆蔻酸加入到 5 个圆底烧瓶中, 并加入 5 ml 无水乙醚, 旋转蒸发除去无水乙醚使脂肪酸在瓶壁上形成的一层薄膜, 加入 5 ml 肌红蛋白 (0.2 mg/ml), 超声 10 min 后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 1 h, 分别进行液相分析。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 电泳分析

已知肌红蛋白的相对分子质量约为 16 000。蛋白层析各个出峰处的收集液及标准品经过 SDS-PAGE 电泳后的凝胶图 (图 1) 显示, 条带 4 和条带 2 处于同一位置, 表明该蛋白层析收集液为肌红蛋白, 条带 4 中只有 1 个条带可见, 条带 3 则含有多个条带, 表明肌红蛋白粗提物经过蛋白层析仪后取得了较好的纯化效果。



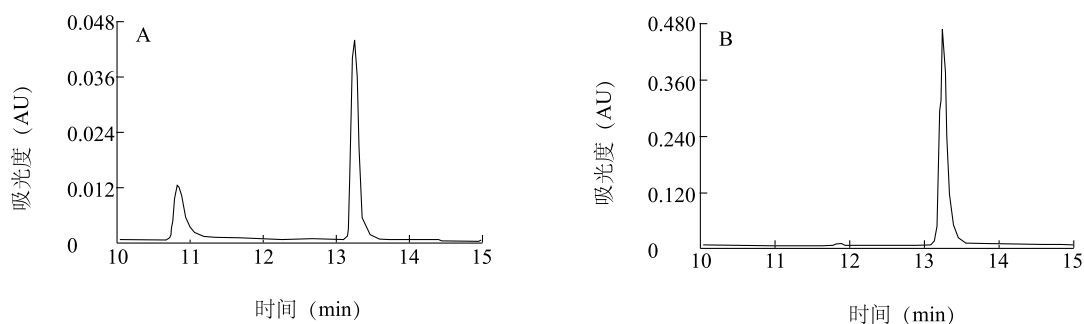
1: Marker; 2: 肌红蛋白标准品; 3: 硫酸铵沉淀后的上清液; 4: 收集的目标肌红蛋白。

图 1 肌红蛋白标准品及牛肉样品收集液的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 1 SDS-PAGE electrophoretogram of myoglobin standard sample and chromatographed beef sample

2.2 液相收集与 ESI-MS 分析

图 2 显示, 在 280 nm 紫外波长下, 肌红蛋白在 10.9 min 和 13.3 min 处有较为明显的吸收峰。当

波长为 400 nm 时,肌红蛋白只在 13.3 min 处有明显的吸收峰。



A:280 nm 紫外波长下肌红蛋白的吸光度;B:400 nm 紫外波长下肌红蛋白的吸光度。

图2 肌红蛋白高效液相色谱

Fig.2 High performance liquid chromatography (HPLC) of myoglobin

由肌红蛋白标品的 ESI-MS 图(通过分析软件 Peakview 进行定性分析)(图 3)可知,在相对分子质量为 17 567.1 和 16 952.0 处有较高的离子峰。肌红蛋白液相色谱 10.9 min 处收集液的 ESI-MS 图(图 4 A)显示,一个明显的离子峰在相对分子质量为 16 952.0 处,另一个较明显的离子峰在相对分子质量为 17 567.7 处。肌红蛋白液相色谱 13.3 min 处收集液 ESI-MS 图(图 4 B)显示,2 个明显的离子峰在相对分子质量为 764.5 和 765.5 处。

综合上述结果,可以推断相对分子质量为 17 567.7 和 16 952.0 离子峰处的层析分离物是肌红蛋白和珠蛋白。推断图 4 B 中相对分子质量为 764.5 的离子峰分离物是血红素辅基,将肌红蛋白液相色谱 13.3 min 处收集液通过紫外波长扫描,其在 400 nm 处有明显的特征峰,表明这是液相色谱 13.3 min 处分离物血红素辅基的特征吸收峰。因此选择波长

400 nm、13.3 min 处的吸收峰作为血红素辅基的特征吸收峰,并通过比较峰面积的大小判断各内源性因素的作用效果。

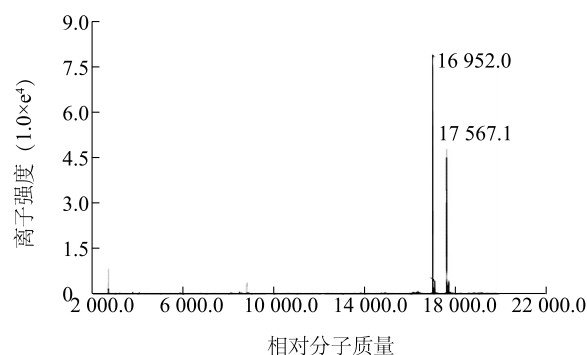


图3 肌红蛋白标品的 ESI-MS 图

Fig.3 ESI-MS of myoglobin standard sample

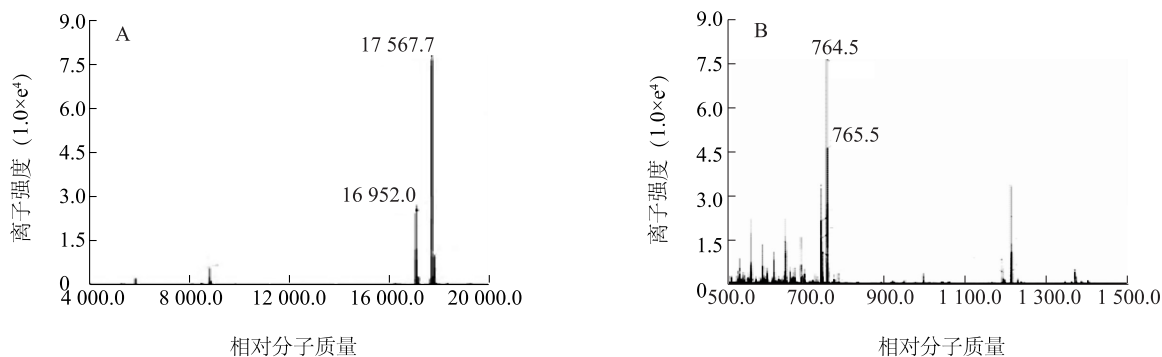


图4 肌红蛋白高效液相色谱 10.9 min(A) 和 13.3 min(B) 处收集液的 ESI-MS 图

Fig.4 ESI-MS of myoglobin sample collected at 10.9 min(A) and 13.3 min(B) by HPLC

2.3 液相分析

2.3.1 乳酸对肌红蛋白血红素辅基的影响 图 5 显示,乳酸处理后肌红蛋白的血红素辅基在 400 nm 处吸收峰峰面积明显低于对照组,乳酸处理 1 h 后,吸收峰面积降低了 28.30%。随着时间的延长,血红素辅基吸收峰面积逐渐降低,与对照组的差异明显($P < 0.05$)。乳酸处理 5 h 时,其吸收峰面积降低了 43.46%,之后则趋于平缓。对照组采用超纯水代替乳酸,其峰面积没有明显变化($P > 0.05$)。试验结果表明,在乳酸的作用下血红素辅基的稳定性降低,可能是乳酸破坏了血红素辅基的结构,导致其共轭体系被破坏,铁离子从血红素辅基中游离了出来。同时,乳酸会降低血红素辅基所在体系的 pH 值,酸性条件不利于血红素辅基结构的稳定^[13]。根据波尔效应,酸性条件下质子取代反应是血红素辅基自动氧化加速的主要原因^[14],从而导致血红素辅基加速氧化。对照组峰面积在 1~6 h 无明显变化,说明血红素辅基在该条件下相对稳定。动物被宰后的排酸过程中,肉的色泽会发生改变^[15]。所以,可以通过控制宰后动物体内乳酸的积累量,减少肌红蛋白血红素辅基的破坏。

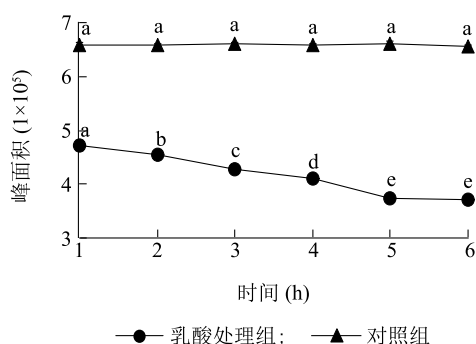


图 5 乳酸对肌红蛋白血红素辅基的影响
Fig.5 Effect of lactic acid on heme prosthetic group of myoglobin

2.3.2 金属离子对肌红蛋白血红素辅基的影响

图 6 显示,随着 Cu^{2+} 浓度的增大,血红素辅基吸收峰面积呈递减趋势,当 Cu^{2+} 浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,吸收峰面积降低了 50.61%。随着 Fe^{2+} 浓度的增大,血红素辅基吸收峰面积呈缓慢上升的趋势,当 Fe^{2+} 浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,吸收峰面积增加了 13.21%。试验结果表明, Cu^{2+} 会破坏血红素辅基的

稳定性,并且随着 Cu^{2+} 浓度的不断增大,这种作用逐渐增强,这是因为 Cu^{2+} 与肌红蛋白血红素辅基中的铁相互作用, Cu^{2+} 将血红素辅基中的铁诱导出来,形成部分空位的肌红蛋白衍生物,这种作用受 Cu^{2+} 浓度的影响,随着 Cu^{2+} 浓度的增大,其对血红素辅基的作用增强^[16-20]。 Fe^{2+} 会增强血红素辅基的稳定性,并且随着 Fe^{2+} 浓度的不断增大,这种作用也逐渐增强,这是因为 Fe^{2+} 可能会降低血红素辅基的氧化速率,从而增加血红素辅基的稳定性^[21]。由于 Fe^{2+} 易被氧化成 Fe^{3+} ,因此 Fe^{2+} 氧化后对血红素辅基的作用还需进一步研究。 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 都是动物体内固有的金属离子,而且 Mg^{2+} 是含量较高的金属离子。图 7 显示,随着 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度的增大,血红素辅基的吸收峰面积无明显变化,说明在该浓度和温度条件下, Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对肌红蛋白血红素辅基稳定性的影响不大。

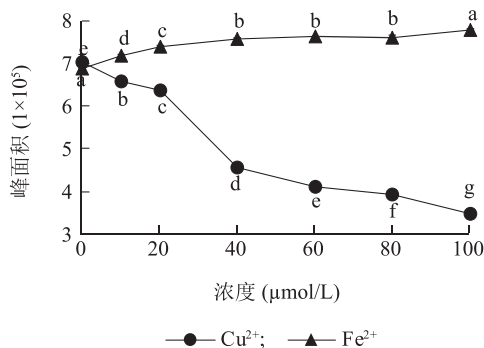
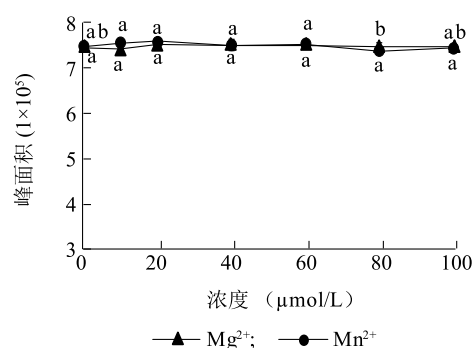


图 6 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 对肌红蛋白血红素辅基的影响
Fig.6 Effects of Cu^{2+} and Fe^{2+} on heme prosthetic group of myoglobin

2.3.3 脂肪酸对肌红蛋白血红素辅基的影响 图 8 显示,在肌红蛋白样品中分别加入油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸、肉豆蔻酸,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 1 h 后,血红素辅基吸收峰面积分别降低了 9.27%、75.46%、69.68%、24.91%、66.48%。加入不同的脂肪酸后,血红素辅基吸收峰面积均明显降低,表明肌红蛋白血红素辅基与脂肪酸之间可能发生相互作用^[22-24]。脂肪酸在常温下易发生氧化,有研究结果表明,脂肪酸氧化或脂肪酸过氧化物分解过程中产生的自由基可能与血红素辅基发生反应,一定浓度的氢过氧化



图中相同小写字母表示同一组内不同处理浓度峰面积差异不显著;不同小写字母表示同一组内不同处理浓度峰面积差异达0.05显著水平。

图7 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对肌红蛋白血红素辅基的影响

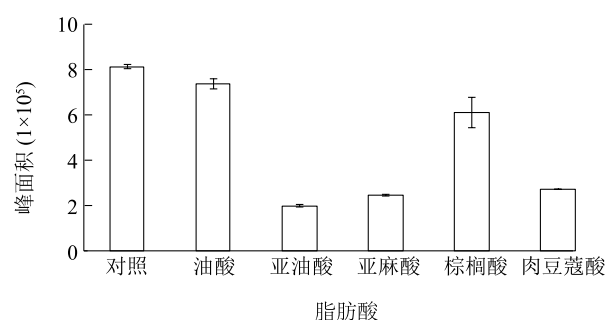
Fig.7 Effects of Mg^{2+} and Mn^{2+} on heme prosthetic group of myoglobin

物会导致肌红蛋白血红素辅基降解,加快血红素辅基的损失速率,从而降低其吸收峰面积^[25]。

在加入脂肪酸的量和处理方法相同的条件下,不同脂肪酸对肌红蛋白血红素辅基的作用强度有较大差异,其中亚油酸、亚麻酸的作用较强,吸收峰面积分别降低了75.46%和69.68%,油酸和棕榈酸的作用较弱,吸收峰面积分别降低了9.27%和24.91%。这可能是因为不同脂肪酸的氧化速率不同,脂肪酸氧化过程中产生的氢过氧化物自由基越多,血红素辅基的损失越大。正常情况下,动物肌肉中不饱和度高的脂肪酸,其脂内氧化越易进行^[26]。亚油酸和亚麻酸的不饱和度为2和3,油酸为单不饱和脂肪酸,棕榈酸为饱和脂肪酸,所以亚油酸和亚麻酸更易被氧化,其对肌红蛋白血红素辅基的作用较强。

3 结论

试验结果表明,肉品中内源性乳酸会破坏血红素辅基的稳定性,随着时间的延长,其作用逐渐增强。金属离子 Cu^{2+} 可以将肌红蛋白中的铁诱导出来,形成部分空位的肌红蛋白衍生物^[22],从而破坏血红素辅基的结构。 Fe^{2+} 在一定程度上会增加血红素辅基的稳定性,随着 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 浓度的不断增大,这2种金属离子的作用也会越来越强,但是由于 Fe^{2+} 极易被氧化,其对血红素辅基的作用机理还需进一步研究。肉品中含有的 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对血红素辅基稳定性的影响不明显。肉品中含有的脂肪酸会加快肌红蛋白血红素辅基的降解,其中不饱和度高



对照:质量浓度为0.2 mg/ml的肌红蛋白溶液,加入一定量双蒸水使乳酸浓度达到100 mmol/L。

图8 各种脂肪酸对肌红蛋白血红素辅基的影响

Fig.8 Effect of fatty acids on heme prosthetic group of myoglobin

的脂肪酸对肌红蛋白血红素辅基的作用较大。

参考文献:

- [1] FAUSTMAN C, CASSENS R G. The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review[J]. Journal of Muscle Foods, 1990, 1(3): 217-243.
- [2] GIDDINGS G G, HULTIN H O. Reduction of ferrimyoglobin in meat[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 1974, 5(2): 143-173.
- [3] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 252.
- [4] 胡 煌,吕 飞,丁玉庭. 肉制品的呈色机理和色泽评定研究进展[J]. 肉类研究, 2016, 30(12): 48-53.
- [5] THIANSILAKUL Y, BENJAKUL S, PARK S Y, et al. Characteristics of myoglobin and haemoglobin-mediated lipid oxidation in washed mince from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 892-900.
- [6] 孙京新,周光宏,徐幸莲,等. 猪肉中氧合肌红蛋白分离、纯化及其氧化特性研究[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 27-31.
- [7] HUHEEY J E. Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity[M]. New York: Harper and Row, 1984.
- [8] NEYA S, HORI H, IMAI K, et al. Remarkable functional aspects of myoglobin induced by diazoheme prosthetic group[J]. The Journal of Biochemistry, 1997, 121(4): 654-660.
- [9] WARRISS P D. Post-mortem changes in muscle and its conversion into meat[M]. Wallingford: CABI Publishing, 2000: 93-105.
- [10] 莎丽娜,靳 烨,席棋乐木格,等. 苏尼特羊肉食用品质的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2008, 29(1): 106-109.
- [11] 苏 冰,王友联,张 枢. 一种适于多肽复合物分析的血红素测定方法[J]. 食品与药品, 2011, 13(3): 117-119.
- [12] KRZYWICKI K. The determination of haem pigments in meat[J]. Meat Science, 1982, 7(7): 29-36.

- [13] YIN M C, FAUSTMAN C. Influence of temperature, pH, and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: a liposome model[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry Journal, 1993, 41(6): 853-857.
- [14] RENERRE M, ANTON M, GATELLIER P. Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles[J]. Meat Science, 1992, 32(3): 331-342.
- [15] 刘佳东,余群力,李永鹏. 宰后冷却牦牛肉排酸过程中肉用品质的变化[J]. 甘肃农业大学学报, 2011, 46(2): 111-114.
- [16] 郑学仿,胡皆汉,许永廷,等. 可见吸收光谱法研究铜锌超氧歧化酶活性中心金属离子与氯化钴的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 1997, 17(5): 35-39.
- [17] 郑学仿,王静云,王 园. 氨基酰化酶与 Cu(II)相互作用的谱学研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21(6): 804-806.
- [18] 唐 乾,曹洪玉,王静云,等. 温度和时间对肌红蛋白血红素铁与金属离子相互作用的影响[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(4): 548-551.
- [19] 唐 乾,郑学仿,王静云,等. 可见光谱法研究肌红蛋白血红素铁与金属离子相互作用(I)[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(7): 1958-1961.
- [20] 冯玉英,杨 辉,顾晓天,等. 荧光光谱法研究肌红蛋白活性中心铁卟啉与铜离子的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(3): 532-534.
- [21] BARON C P, ANDERSEN H J. Myoglobin-induced lipid oxidation: a review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(14): 3887-3897.
- [22] SHIH L. The interaction of fatty acid with heme proteins and its implication in fatty acid metabolism[C]. State of California: University of California Davis, 2015: 2-9.
- [23] LEE S K, TATIYABORWORNTHAM N, GRUNWALD E W, et al. Myoglobin and haemoglobin-mediated lipid oxidation in washed muscle: observations on crosslinking, ferryl formation, porphyrin degradation, and haemin loss rate[J]. Food Chemistry, 2015, 167: 258-263.
- [24] FAUSTMAN C, SUN Q, MANCINI R, et al. Myoglobin and lipid oxidation: mechanistic bases and control [J]. Meat Science, 2010, 86(1): 86-94.
- [25] KOKATNUR M G, BERGAN J G, DRAPER H H. Observations on the decomposition of hemin by fatty acid hydroperoxides[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology&Medicine, 1966, 123(2): 314-317.
- [26] 劳邦盛,盛国英,傅家谟,等. 牡蛎中脂肪酸在储藏过程中的稳定性[J]. 色谱, 2000, 18(4): 340-342.

(责任编辑:王 妮)