

舒丽枝, 时苗苗, 张牧焱, 等. 卟啉类化合物和游离铁对鸡胸肉肌原纤维蛋白理化特性的影响[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(10): 1952-1961.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.10.020

卟啉类化合物和游离铁对鸡胸肉肌原纤维蛋白理化特性的影响

舒丽枝^{1,2}, 时苗苗^{1,2}, 张牧焱¹, 卞欢¹, 徐为民^{1,2}, 王道营^{1,2}

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了解卟啉铁及其产生的原卟啉和游离铁对鸡胸肉肌原纤维蛋白(MP)和肉品质影响, 本研究分别用原卟啉(PPIX)、卟啉铁(Hemin)和游离铁(FeCl_3)结合加热处理鸡胸肉, 并测定鸡胸肉肌原纤维蛋白的结构和理化性质的变化。结果表明, 卟啉铁、游离铁和原卟啉会使MP的溶解度显著降低($P < 0.05$), 浊度增加, 平均粒径从空白加热组的531 nm分别增加到1 280 nm、955 nm和712 nm, 说明鸡胸肉肌原纤维蛋白发生了交联聚集; 卟啉铁和游离铁能促进蛋白质羰基的生成($P < 0.05$), 而原卟啉处理对蛋白质羰基含量没有显著改变($P > 0.05$), 但三者均可引起蛋白质疏水性提高; 卟啉类化合物和游离铁处理能显著降低蛋白质分子间氢键和离子键含量, 提高疏水相互作用力和二硫键含量, 减弱肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用, 促使肌动蛋白-肌球蛋白发生解离; 卟啉铁和游离铁对蛋白质理化特性的改变破坏了蛋白质凝胶结构, 降低了蛋白质的黏度、弹性模量和黏度损耗模量。本研究为明确卟啉类化合物对肌原纤维蛋白特性和肉品质影响提供了参考, 为调控鸡肉嫩度提供了理论依据。

关键词: 原卟啉; 卟啉铁; 游离铁; 嫩度; 肌原纤维蛋白

中图分类号: TS251.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)10-1952-10

Effect of porphyrins and free iron on physicochemical properties of myofibrillar protein of chicken breast muscle

SHU Lizhi^{1,2}, SHI Miaomiao^{1,2}, ZHANG Muhan¹, BIAN Huan¹, XU Weimin^{1,2}, WANG Daoying^{1,2}

(1. Institute of Agricultural Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To understand the effects of ferroporphyrins and protoporphyrin IX (PPIX) produced by ferroporphyrins and free iron on myofibrillar protein (MP) of chicken breast muscle and meat quality, chicken breast muscles were incubated with PPIX, hemin and free iron (FeCl_3) combined with thermal treatment respectively, and the changes of the structure and physicochemical properties of MP from chicken breast muscle were determined. The results showed that ferroporphyrin, free iron, and protoporphyrin IX could significantly reduce the solubility of MP ($P < 0.05$) and increase its turbidity. The average particle size increased from 531 nm in the blank heating group to 1 280 nm, 955 nm, and 712 nm, respectively, indicating that the cross-linking and aggregation happened in the MP of chicken breast muscle.

Ferroporphyrin and free iron could promote the generation of protein carbonyl groups ($P < 0.05$), while protoporphyrin IX treatment did not significantly change the content of protein carbonyl groups ($P > 0.05$), but the three compounds could cause an increase in protein hydrophobicity. Porphyrin compounds and free iron treatments could

收稿日期: 2024-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(32372406); 江苏省科技计划项目(BK20231391)

作者简介: 舒丽枝(1999-), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向为肉品加工与质量控制。(E-mail) 18110676526@163.com

通讯作者: 张牧焱, (E-mail) zhangmh06@sina.com

significantly reduce contents of hydrogen bond and ionic bond between protein molecules, increase hydrophobic interactions and disulfide bond content, weaken the interaction between actin and myosin, and promote the dissociation of actin-myosin. The changes of physical and chemical properties of protein caused by Hemin and free iron destroyed the structure of protein gel, and reduced the viscosity, storage modulus and loss modulus of protein. This study lays the foundation for clarifying the effects of porphyrin compounds on myofibrillar protein properties and meat quality, and provides a theoretical basis for regulating chicken tenderness.

Key words: protoporphyrin IX; ferroporphyrin; free iron; tenderness; myofibrillar protein

鸡肉是中国人的主要食用肉类之一,富含大量优质蛋白质并且脂肪、胆固醇含量低。其中肌原纤维蛋白(MP)占总蛋白质含量的50%以上,是一类具有重要生物学功能特性的结构蛋白^[1]。MP因具有水结合能力、凝胶能力以及乳化特性等,在肉品的保水性、嫩度、色泽等最终品质形成过程中具有关键作用^[1]。

肌红蛋白是肉品中主要的呈色物质,其状态决定宰后肉品色泽变化。肉类在贮藏和加热过程中,肌红蛋白极易变性降解,引起卟啉铁(Hemin)脱落,卟啉铁在氧化剂的作用下进一步被破坏,形成原卟啉(PPIX)和游离铁离子^[2-3]。肌红蛋白、卟啉铁和游离铁已被证实对蛋白质氧化和脂质氧化具有促进作用,对肉品的嫩度、保水性和色泽均有显著影响^[4]。前期的研究结果显示,卟啉铁和游离铁可引起肌原纤维蛋白发生氧化、聚集,影响凝胶的强度和保水性^[5]。我们在用原卟啉及卟啉铁对鸡胸肉进行处理时发现,经卟啉铁和原卟啉处理后,鸡胸肉的嫩度得以改善^[6]。但卟啉铁和原卟啉对鸡胸肉嫩度的作用机制和对肌原纤维蛋白的影响还未有深入研究。

因此,本研究拟采用原卟啉、卟啉铁和游离铁协同加热处理鸡胸肉,提取肌原纤维蛋白,分别测定肌原纤维蛋白理化特性的变化,研究卟啉类物质和游离铁对鸡胸肉肌原纤维蛋白的影响,明确其引起鸡胸肉品质变化的机制,以期加工过程中肉品嫩度的调控提供一定的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

生鲜鸡胸肉从当地市场购买,取样时间为宰后10~12 h, pH 为6.40~6.45。原卟啉(纯度 $\geq 95\%$, 2~8℃保存)、氯化血红素(纯度98%,避光,2~8℃保存)购自上海源叶生物技术有限公司;氯化铁、氯

化钠、氯化镁、乙二醇双四乙酸(EGTA)等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

HH-8 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司产品),M124A 电子分析天平(意大利 BEL 公司产品),T-25 数显匀浆机(德国 IKA 公司产品),Uni-Cen MR 冷冻离心机(德国 Herolab 公司产品),Gen5 多功能酶标仪(美国 Biotek 公司产品),Zeta-sizer Nano ZSE 电位仪(上海思百吉仪器系统有限公司产品),HI-9125 酸度计(意大利 Hanna 公司产品),Tanon-1600 全自动凝胶成像分析仪(上海天能仪器有限公司产品),Mini-PROTEAN Tetra Cell 垂直电泳(美国 Bio-Rad 公司产品),Jasco 1500 圆二色谱仪(日本 Jasco 公司产品),Nicolet iS-5 型傅里叶变换红外色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 产品),MCR302 流变仪(奥地利安东帕有限公司产品),Discovery HR10 混合流变仪(美国 TA 仪器公司产品)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理及肌原纤维蛋白的提取 将生鲜鸡胸肉分割成大小形状一致的肉样(约120 g)备用。将肉样分别浸泡在溶解了0.5 mmol/L原卟啉、血红素或六水合三氯化铁的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液(10 mmol/L, pH 7.0)中,其中新鲜的肉样为 Fresh 组,100℃加热1 h 的肉样为 Heat 组,用 Tris-HCl 缓冲液处理并于100℃加热1 h 的肉样为 Tris 组,用0.5 mmol/L原卟啉处理并于100℃加热1 h 的肉样为 PPIX 组,用0.05 mmol/L血红素处理并于100℃加热1 h 的肉样为 Hemin 组,用0.05 mmol/L六水合三氯化铁处理并于100℃加热1 h 的肉样为 FeCl₃组。加热后用冰水冷却并进行各项指标的测定。取30 g 碎肉样品于100 mL 离心管中,分别添加4倍体积的肌原纤维蛋白分离缓冲溶液(成分为0.1 mol/L NaCl, 2.0

mmol/L MgCl_2 , 1.0 mmol/L EGTA, 6.1 mmol/L Na_2HPO_4 , 3.9 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; pH 7.0, 4 ℃), 在冰浴中以 10 000 r/min 的速度均质 60 s, 然后进行离心 (2 000 g, 15 min, 4 ℃), 去除上清液并收集沉淀物。以上过程重复 2 次。然后将沉淀物与 8 倍体积的缓冲液 B (成分为 0.1 mol/L NaCl, 1.0 mmol/L NaN_3 ; pH 6.0) 混合, 在冰浴中均质 (10 000 r/min, 60 s), 再次离心 (2 000 g, 15 min, 4 ℃) 并去除沉淀物。将沉淀物通过 4 层纱布过滤, 将滤液离心得到纯化的肌原纤维蛋白, 将其溶解在适量的 PB 缓冲液 (0.6 mol/L KCl, 10 mmol/L K_2HPO_4) 中待用。

1.3.2 肌原纤维蛋白浊度、溶解度和粒径的测定 用 PB 缓冲溶液将 MP 溶液质量浓度调整为 1 mg/mL, 取适量 1.3.1 节中提取的肌原纤维蛋白溶液, 检测其在 600 nm 处的吸光度, 以 PB 缓冲溶液作为空白对照, 此时的 OD 值为 MP 的浊度。

取 2 mL 肌原纤维蛋白溶液于冷冻离心机中离心 (1 500 g, 20 min, 4 ℃)。之后取上清液, 测定肌原纤维蛋白浓度, 溶解度为上清液与原肌原纤维蛋白溶液中蛋白质浓度的比值, 即为 MP 的溶解度。

将 MP 溶液经过不同处理后, 用 Zeta 电位仪对 MP 的粒径进行测定, 每个处理组测量 3 次。得出肌原纤维蛋白的粒径分布图。

1.3.3 肌原纤维蛋白羰基含量的测定 样品经处理后, 用考马斯亮蓝试剂盒测定 MP 上清液中的蛋白质浓度, 测定步骤以及肌原纤维蛋白羰基含量的计算根据羰基测定试剂盒说明书进行。羰基衍生物则可与 2,4-二硝基苯肼反应生成 2,4-二硝基苯腙衍生物, 该衍生物在 387 nm 处有强吸收。

1.3.4 总巯基和游离巯基含量的测定 总巯基含量的测定: 用磷酸盐缓冲液 (10 mmol/L, pH 7.0) 调整肌原纤维蛋白溶液质量浓度为 5 mg/mL。将 0.5 mL 肌原纤维蛋白溶液与 4.5 mL 的尿素-十二烷基硫酸钠 (SDS) (8.0 mol/L 尿素, 30 g/L SDS, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0) 混合, 然后加入 0.5 mL Ellman 试剂 [0.1% 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB), 0.2 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5] 混合。在 4 ℃ 条件下孵育 24 min 后, 在 412 nm 处测量上清液的吸光度 (A)。

游离巯基含量的测定: 取 0.5 mL MP 溶液样品 (质量浓度为 5 mg/mL) 与 4.5 mL 0.02 mol/L

Tris-HCl 缓冲液 [10 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na), 2% SDS, pH 7.5], 然后加入 0.5 mL Ellman 试剂 (0.1% DTNB, 0.2 mol/L Tris-HCl, pH 7.5) 混合, 在 4 ℃ 条件下孵育 1 h 后测定吸光度。按以下公式进行计算:

$$\text{巯基含量} [\text{mmol}/(\text{g} \cdot \text{L})] = p \times n \times \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}}{e \times 10^3}$$

式中, n : 稀释倍数; p : 肌原纤维蛋白样品的浓度; e : 摩尔消光系数 [13 600 L/(mol · cm)]; $A_{\text{样品}}$: 样品的测定值; $A_{\text{对照}}$: 对照的测定值。

1.3.5 表面疏水性的测定 取 1 mL 质量浓度为 5 mg/mL 的 MP 溶液, 加入 200 μL 质量浓度为 1 mg/mL 的溴酚蓝溶液 (BPB)。搅拌均匀, 离心 (6 800 g, 15 min), 然后取上清液在 595 nm 处对目标样品进行吸光度的测定, 测定值记为 A_1 。空白对照用磷酸盐缓冲液的吸光度来表示, 测定值记为 A_2 。以溴酚蓝与肌原纤维蛋白表面疏水性氨基酸的结合量来反映表面疏水性 (μg) 的大小, 计算公式如下所示:

$$\text{表面疏水性} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 200$$

1.3.6 肌动蛋白提取和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析 将处理后的 2 g 肉糜样品置于 20 mL 的 Weber-Edsall 提取液 (成分为 0.60 mol/L KCl, 0.01 mol/L Na_2CO_3 , 0.04 mol/L NaHCO_3 , pH 7.2) 中, 于冰浴中 15 000 r/min 匀浆 3 次 (每次 30 s, 间隔 30 s)。将匀浆液置于 4 ℃ 恒温摇床培养箱中振荡 24 h 后, 加入 40 mL 蒸馏水稀释, 使提取液中 KCl 的终浓度为 0.20 mol/L, 4 ℃ 摇床振荡 60 min 后将溶液进行离心分离, 离心条件为: 4 ℃、15 000 g, 20 min; 弃去上清液后, 重新加入 20 mL Weber-Edsall 提取液, 再加入 40 mL 蒸馏水稀释, 用 2 层尼龙网过滤以弃去不溶物质后, 4 ℃ 摇床振荡 60 min 后再进行离心 (4 ℃、15 000 g, 20 min) 分离, 弃去上清液, 将沉淀溶解于 5 mL KCl-Tris 溶液 (0.6 mol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2) 中。接着用蒸馏水将沉淀稀释到 KCl 的浓度为 0.20 mol/L, 提取肌动蛋白。

1.3.7 对肌原纤维蛋白进行 SDS-PAGE 分析 分别取 100 μL 不同处理组的肌原纤维蛋白溶液, 质量浓度均为 10 mg/mL, 向其中加入 25 μL 的蛋白上样缓冲液 (2% SDS、0.1% 溴酚蓝、10% 甘油、Tris-HCl

缓冲液),充分混匀后,在干浴锅中进行干燥处理(95 ℃,5 min)。取出并冷却至室温后,进行离心(25 ℃,12 000 g,5 min),离心后分别取 10 μL 的上清液用于 SDS-PAGE 分析(分离胶浓度和浓缩胶浓度分别为 12%和 5%)。凝胶用考马斯亮蓝染色 15~30 min,之后于摇床上均匀脱色,用全自动凝胶成像分析仪对脱色凝胶进行成像分析。

1.3.8 分子间作用力的测定 分子间作用力的测定参考 Tan 等^[7]的方法并稍作修改。取 2 g 经过原卟啉、卟啉铁和游离铁处理后的鸡胸肉,分别与 10 mL 的 SA、SB、SC、SD、SE 溶液(其中,SA 为 0.05 mol/L 的氯化钠溶液;SB 为 0.60 mol/L 的氯化钠溶液;SC 为 SB 与 1.50 mol/L 尿素溶液相混合的溶液;SD 为 SB 与 8.00 mol/L 尿素溶液相混合的溶液;SE 为 SD 与 1.50 mol/L β-巯基乙醇溶液相混合的溶液)混合均匀。然后将混合后的溶液在高速匀浆机上进行匀浆(4 000 r/min、3~5 min、4 ℃),使肉样与试剂充分反应,于 4 ℃静置 1 h,取出后在离心机中进行离心(15 000 g,10 min,4 ℃),然后测定上清液中肌原纤维蛋白质量浓度,用 SA、SB、SC、SD、SE 来表示,并按下式计算分子间作用力的大小:

离子键含量(mg/mL)=SB-SA

氢键含量(mg/mL)=SC-SB

疏水相互作用力(mg/mL)=SD-SC

二硫键含量(mg/mL)=SE-SD

式中,SA、SB、SC、SD、SE 表示肌原纤维蛋白质量浓度。

1.3.9 表观黏度的测定 采用 MCR302 流变仪对经过原卟啉、卟啉铁和游离铁处理后的肌原纤维蛋白溶液的表观黏度进行测定。参数设定:直径 40 mm;板间距 1 mm,剪切速率 0.01~100.00 s⁻¹。试验在常温下进行。记录此过程中剪切应力和表观黏度随剪切速率的变化,并绘制相应的曲线。

1.3.10 动态流变学特性的测定 模拟肌原纤维蛋白加热过程中的变化,采用经原卟啉、卟啉铁和游离铁处理后的肌原纤维蛋白溶液(质量浓度为 10 mg/mL),进行肌原纤维蛋白动态流变学特性的测定。流变仪夹具的测试参数设置为 25 mm,上下板的间隔设定为 1 000 μm,频率为 1.0 Hz,应变为 2%,温度以 2 ℃/min 的速率从 20 ℃升高到 80 ℃,记录此过程中弹性模量(G')和黏度损耗模量(G'')

随温度的变化。

1.4 数据处理与分析

采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因素方差分析检验, $P<0.05$ 表示差异显著。所得数据以平均值±标准差表示。采用 Origin Pro 2021 软件进行数据的绘图分析。

2 结果与分析

2.1 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白聚集特性的影响

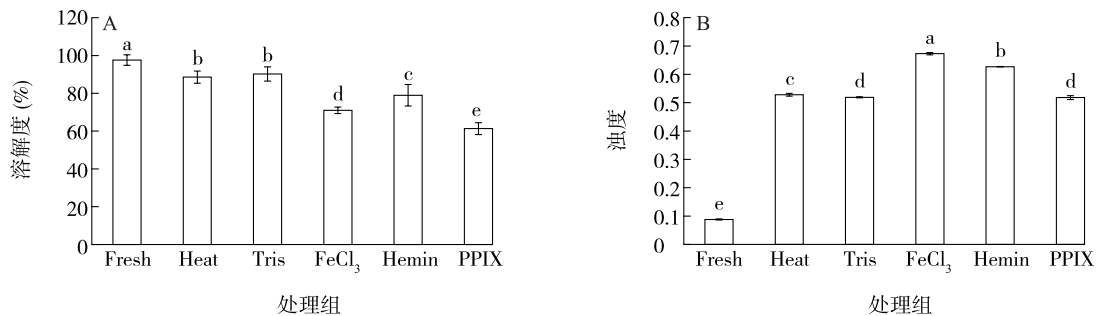
图 1 显示了原卟啉(PPIX 处理组)、卟啉铁(Hemin 处理组)和游离铁(FeCl_3 处理组)对鸡胸肉肌原纤维蛋白聚集特性的影响。由图 1A 可知,与空白加热组(Heat 组)和 Tris 处理加热组(Tris 组)相比,PPIX 处理组、Hemin 处理组和 FeCl_3 处理组鸡胸肉肌原纤维蛋白的溶解度均显著降低($P<0.05$)。而相较于 PPIX 处理组,Hemin 和 FeCl_3 处理组对浊度的影响更大。溶解度降低、浊度增大均可反映肌原纤维蛋白发生了一定程度的交联聚集。从肌原纤维蛋白粒径大小的分布图中也可以直观地看出肌原纤维蛋白的聚集和降解状态。由图 2 可知,经 FeCl_3 、Hemin、PPIX 处理后,3 个处理组的肌原纤维蛋白平均粒径大小依次为 955 nm、1 280 nm、712 nm,而 Heat 处理组肌原纤维蛋白分子的平均粒径为 531 nm,说明经 Hemin、PPIX 和 FeCl_3 处理后,肌原纤维蛋白分子的粒径均显著增大($P<0.05$),且 Hemin 处理组的变化最为明显。这与 Nawaz 等^[8]的研究结果一致,他们发现,不同的氧化系统可引起蛋白质的交联,导致不同程度的聚集。

2.2 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白氧化特性的影响

蛋白质的氧化程度可根据羰基含量来判断,羰基含量越高,代表蛋白质受到的氧化损伤越大。由图 3A 可知,与 Heat 处理组和 Tris 处理组相比,经过 FeCl_3 、Hemin 孵育后的鸡胸肉肌原纤维蛋白羰基含量显著增加($P<0.05$)。但经 PPIX 孵育后,与 Heat 处理组和 Tris 处理组相比,羰基含量未见显著增加。我们前期的研究表明,血红素铁和非血红素铁都是肉品中脂质氧化和蛋白质氧化的催化剂,且血红素铁对促进蛋白质氧化更有效^[5]。Wang 等^[9]的研究结果表明血红素蛋白对肌原纤维蛋白的氧化速

率要高于游离铁。本研究中,Hemin 和 FeCl_3 都能引起蛋白质氧化,而 PPIX 的加入对巯基含量影响不

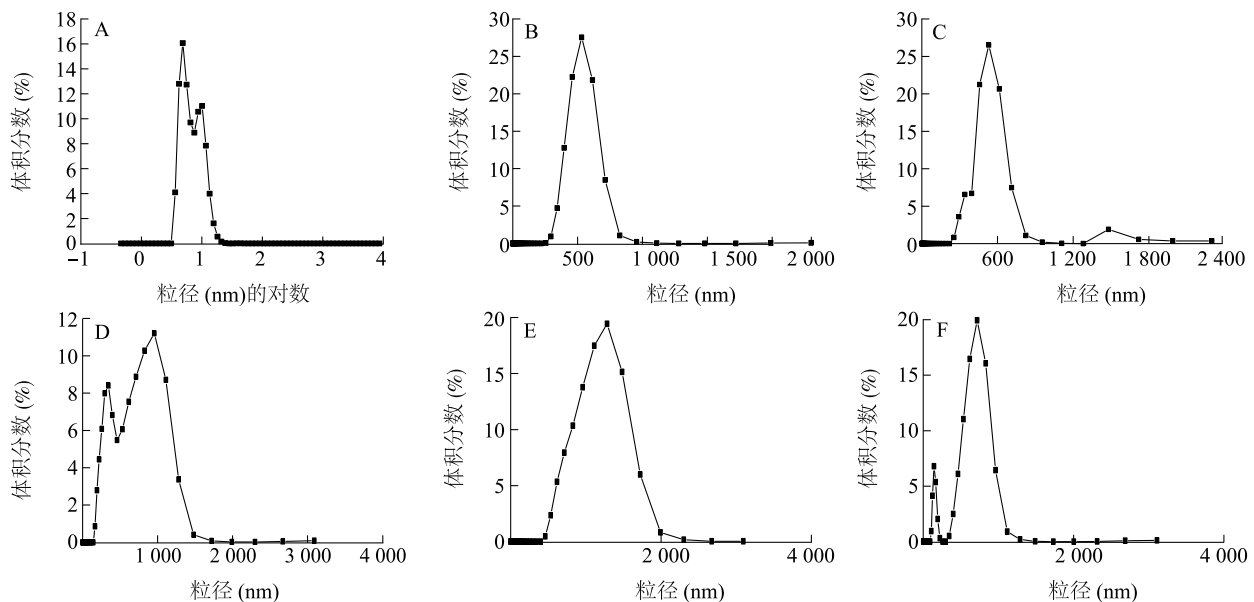
大,可能是因为 PPIX 本身并不含有能引起氧化反应的铁离子。



Fresh 处理组:新鲜的肉样;Heat 处理组:100 ℃加热 1 h 的肉样;Tris 处理组:用 Tris-HCl 缓冲液于 100 ℃加热 1 h 的肉样;PPIX 处理组:用 0.5 mmol 原卟啉于 100 ℃加热 1 h 的肉样;Hemin 处理组:用 0.05 mmol 血红素于 100 ℃加热 1 h 的肉样; FeCl_3 处理组:用 0.05 mmol 六水合三氯化铁于 100 ℃加热 1 h 的肉样。图上不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白溶解度 (A) 和浊度 (B) 的影响

Fig.1 Effect of porphyrins and free iron on solubility (A) and turbidity (B) of myofibrillar protein



A: Fresh 处理组;B: Heat 处理组;C: Tris 处理组;D: FeCl_3 处理组;E: Hemin 处理组;F: PPIX 处理组。Fresh 处理组、Heat 处理组、Tris 处理组、PPIX 处理组、Hemin 处理组、 FeCl_3 处理组见图 1 注。

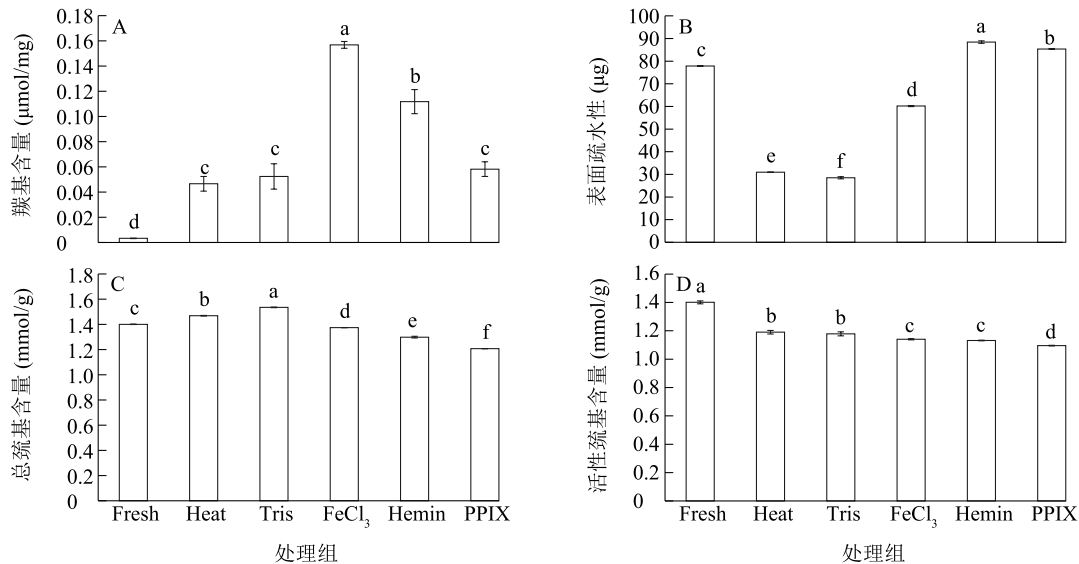
图 2 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白粒径的影响

Fig.2 Effect of porphyrins and free iron on particle size of myofibrillar protein

表面疏水性可用来评价蛋白质表面疏水性氨基酸残基的暴露程度。由图 3B 可知,与 Heat 组、Tris 组相比,经原卟啉、卟啉铁和游离铁处理后,肌原纤维蛋白的表面疏水性显著增加 ($P < 0.05$)。Hemin 和 PPIX 处理对鸡胸肉肌原纤维蛋白表面疏水性的影响更大。说明当这 3 种化合物作用于 MP 时,肌原纤维蛋白结构被充分打开,被掩埋的疏水性基团暴露,使

表面疏水性基团含量显著增加。其中 Hemin 和 FeCl_3 的氧化作用可能导致肌原纤维蛋白的二级结构和三级结构发生变化,使得非极性氨基酸暴露,表面疏水性增加,这与 Fu 等^[10]的研究结果一致。

巯基含量也可作为检测蛋白质氧化程度的指标。由图 3C 和图 3D 可知,与 Heat 处理组和 Tris 处理组相比,经 FeCl_3 、Hemin、PPIX 处理的肌原纤维



Fresh 处理组、Heat 处理组、Tris 处理组、PPIX 处理组、Hemin 处理组、FeCl₃ 组见图 1 注。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白氧化特性的影响

Fig.3 Effect of porphyrins and free iron on the oxidative properties of myofibrillar protein

蛋白的总巯基含量和活性巯基含量均呈下降的趋势。说明这 3 种化合物有助于将巯基转化为分子间的二硫键^[11-12]。PPIX 虽不含铁离子,但对巯基含量有显著影响,可能是由于 PPIX 可与肌原纤维蛋白相互作用,引起肌原纤维蛋白结构和性质的改变^[13]。

2.3 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白分子间作用力的影响

由表 1 可知,与 Heat 处理组和 Tris 处理组相比,经 Hemin、PPIX 和 FeCl₃ 处理后鸡胸肉肌原纤维蛋白的离子键含量显著降低 ($P < 0.05$)。有研究结果显示,离子键维持着肌原纤维蛋白的三级结构,离子键被破坏意味着肌原纤维蛋白发生聚集^[14]。氢键是维持蛋白质二级结构的重要作用力,可维持蛋白质的 α -螺旋结构,氧化会使蛋白质的氢键和 α -螺旋结构受到破坏^[15]。与 Heat 组相比,各处理组蛋白质氢键含量也有所降低,但 FeCl₃ 处理组的变化比 Hemin 处理组和 PPIX 处理组小。

与 Heat 处理组和 Tris 处理组相比,经 Hemin、PPIX 和 FeCl₃ 处理后肌原纤维蛋白的疏水相互作用力显著增强 ($P < 0.05$),并且 Hemin 的作用效果最好。卟啉类物质具有疏水特性,它们的加入引起了蛋白质结构中疏水性基团的变化^[16]。此外,与 Heat 组、Tris 组相比,经原卟啉 (PPIX)、卟啉铁 (Hemin)

和游离铁 (FeCl₃) 孵育后的鸡胸肉二硫键含量显著增加,并且 Hemin 的作用效果最好,与其他处理间差异显著 ($P < 0.05$)。这表明原卟啉、卟啉铁及游离铁均会引起巯基氧化成二硫键,这与巯基含量的变化结果一致。

表 1 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白分子间作用力的影响

Table 1 Effect of porphyrins and free iron on the intermolecular force of myofibrillar protein

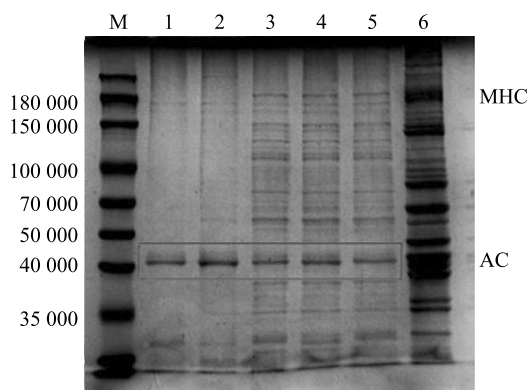
处理	离子键含量 (mg/mL)	氢键含量 (mg/mL)	疏水相互作用力 (mg/mL)	二硫键含量 (mg/mL)
Fresh 组	0.42±0.03a	0.70±0.05a	1.19±0.02d	0.52±0.02e
Heat 组	0.37±0.0b	0.29±0.03b	1.52±0.02c	1.42±0.04d
Tris 组	0.30±0.02c	0.22±0.0c	1.49±0.10c	1.33±0.02d
FeCl ₃ 组	0.08±0.01e	0.19±0.0cd	2.11±0.04b	1.97±0.09c
Hemin 组	0.10±0.01e	0.11±0.01e	2.57±0.01a	2.59±0.03a
PPIX 组	0.24±0.01d	0.15±0.01de	2.16±0.03b	2.08±0.08b

Fresh 处理组、Heat 处理组、Tris 处理组、PPIX 处理组、Hemin 处理组、FeCl₃ 处理组见图 1 注。同一列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 卟啉类化合物和游离铁对肌动蛋白-肌球蛋白解离的影响

图 4 显示了经 Hemin、PPIX 和 FeCl₃ 处理后肌动蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,它可以直观地反映肌动蛋白的含量和肌动球蛋白的解离情况。

Hemin、PPIX 和 FeCl_3 处理后,蛋白质条带在相对分子量 40 000 附近有明显加深现象,说明肌动蛋白-肌球蛋白发生了明显的解离现象,并且 Hemin 组尤为明显。目前国内外研究认为肌原纤维结构弱化是肉品嫩度改善的主要原因,肌球蛋白和肌动蛋白作为肉中主要的结构蛋白,它们之间相互结合力的减弱与肌肉微观结构的瓦解和嫩度的改善密切相关^[17]。肌球蛋白头部主要通过疏水相互作用与肌动蛋白结合,卟啉类物质可能屏蔽肌动蛋白-肌球蛋白结合位点的疏水结构域,从而抑制肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用^[18]。



1: PPIX 处理组; 2: Hemin 处理组; 3: FeCl_3 处理组; 4: Tris 处理组; 5: Heat 处理组; 6: Fresh 处理组。Fresh 处理组、Heat 处理组、Tris 处理组、PPIX 处理组、Hemin 处理组、 FeCl_3 处理组见图 1 注。AC: 肌动蛋白; MHC: 肌球蛋白重链。

图 4 不同处理组肌动球蛋白的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结果

Fig. 4 Results of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for actomyosin from different treatment groups

2.5 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白流变特性的影响

图 5 显示了卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白表观黏度的影响。由图 5A 可知,所有处理组的剪切应力均随着剪切速率的增加而逐渐增加,但与 Fresh 和 Heat 组相比,卟啉铁、游离铁和原卟啉处理组的剪切应力变化较为缓慢。由图 5B 可知,随着剪切速率的增加,各处理组肌原纤维蛋白溶液的表观黏度均呈现先升高后下降,最后趋于平稳的趋势,属于非牛顿流体。在 $0.1 \sim 1.0 \text{ s}^{-1}$ 剪切速率范围内,不同处理组的表观黏度大小依次为 Fresh 处理组 > Heat 处理组 > Hemin 处理组 > Tris 处理组 > FeCl_3

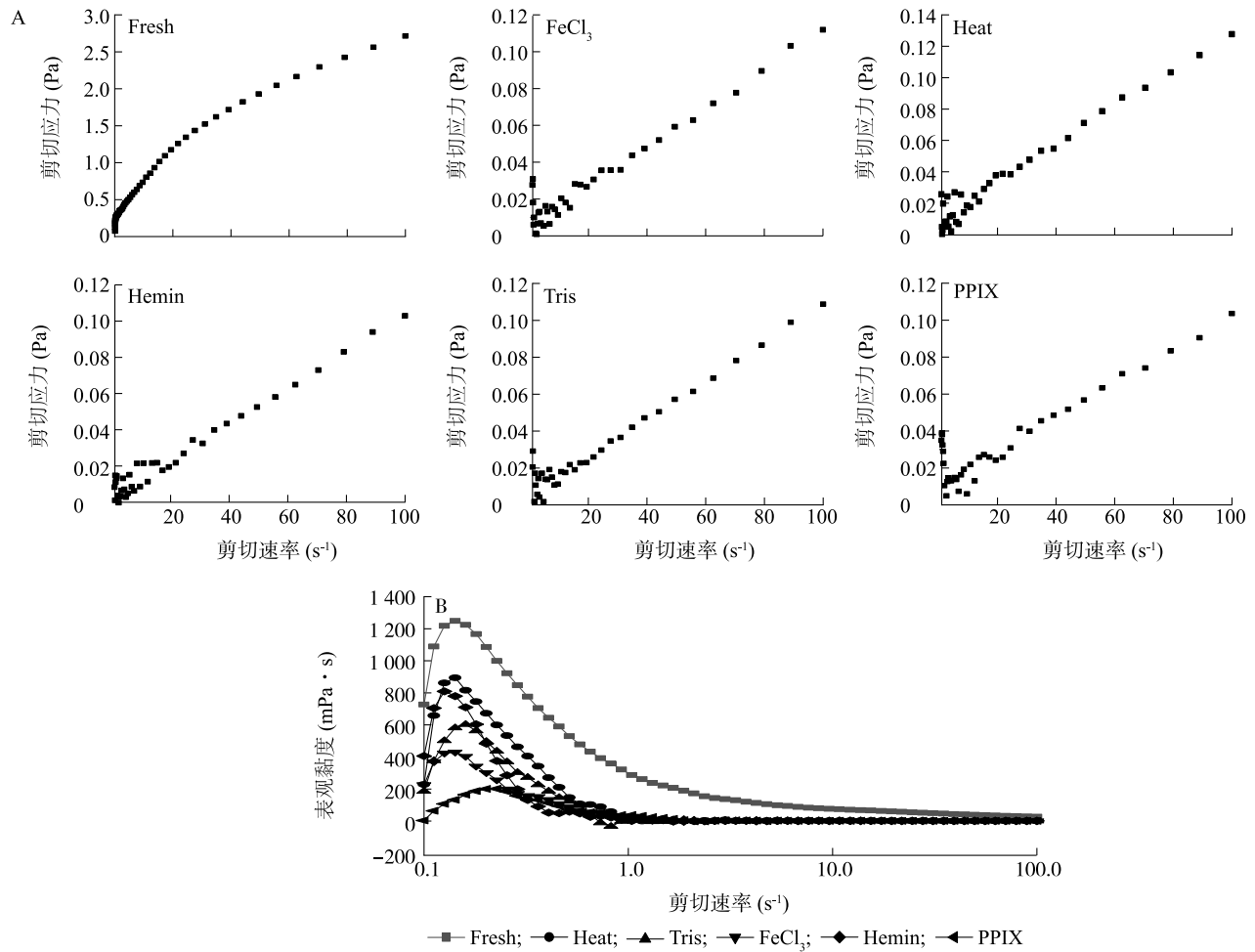
处理组 > PPIX 处理组; Hemin 处理组、 FeCl_3 处理组和 PPIX 处理组的表观黏度均减小,可能是因为蛋白质间的分子间作用力减小,加快了其流动速度。当剪切力增大到一定值后,肌原纤维蛋白溶液体系间的分子运动达到动态平衡并趋于稳定^[19]。

图 6 显示了 Hemin、 FeCl_3 和 PPIX 作用于肌原纤维蛋白时,对蛋白质形成凝胶过程中弹性模量 (图 6A) 和黏度损耗模量 (图 6B) 的影响。弹性模量 (G') 可用来评估蛋白质凝胶网络结构的弹性, G' 的大小可显示蛋白质三维网络结构的稳定性^[20]。 G'' 表示加热过程中黏性的变化,表示物质受到外力作用时的变形程度^[21],可以反映肌原纤维蛋白结构的折叠和聚集情况。图 6 中 G' 和 G'' 的变化趋势相似。由图 6 可知,在 $20 \sim 80^\circ\text{C}$, FeCl_3 和 Hemin 处理组的 G' 和 G'' 几乎没有变化,而 PPIX 处理组的 G' 和 G'' 在 $40 \sim 55^\circ\text{C}$ 逐渐上升,随后在 $55 \sim 60^\circ\text{C}$ 下降,最后在 $60 \sim 80^\circ\text{C}$ 又呈现上升趋势,此时可能形成了持续的不可逆的交联肌球蛋白丝^[22]。与其他组相比, Fresh 组的 G' 和 G'' 变化最大, G' 和 G'' 的峰值均高于加入卟啉类化合物和游离铁孵育的肌原纤维蛋白的 G' 和 G'' 。

热胶凝是蛋白质变性的结果,会导致其分子间共价键或非共价键的有序形成,从而形成连续的网络结构^[23]。相对于 Fresh 处理组和 Tris 处理组,本研究中 FeCl_3 处理组和 Hemin 处理组肌原纤维蛋白的 G' 和 G'' 降低,表明游离铁和卟啉铁能引起肌原纤维蛋白氧化,从而对蛋白质凝胶的形成过程产生破坏作用。可能是因为经过这 2 种化合物处理后,肌球蛋白重链展开,头部发生交联,肌球蛋白轻链变性和尾部展开,使得凝胶网络结构发生一定的变化^[24]。魏苏萌等^[25]在研究中发现氧化能改变肌原纤维蛋白的弹性模量,及其凝胶中蛋白的二级结构和分子间作用力; Ooizumi 等^[26]的研究结果显示,在氧化体系下,肌球蛋白发生氧化后弹性模量会降低,与本研究结果一致。但原卟啉处理组的 G' 和 G'' 与 Tris 处理组差别不大,说明其对肌原纤维蛋白的流变性影响较小,相较于游离铁和卟啉铁处理组,其更有利于维持肌原纤维蛋白凝胶结构的稳定。可能是因为原卟啉本身不含有具有氧化催化作用的铁离子,不过相关机制还有待进一步研究。

3 结论

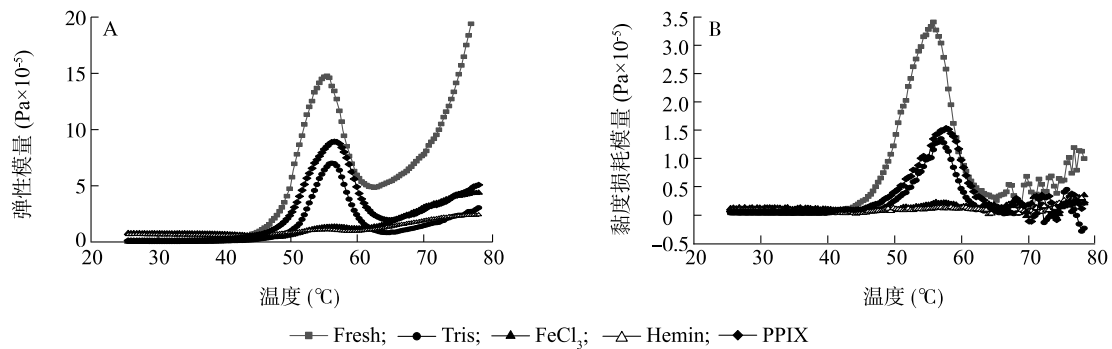
本研究用卟啉化合物及游离铁孵育鸡胸肉,加



Fresh 处理组、Heat 处理组、Tris 处理组、FeCl₃ 处理组、Hemin 处理组、PPIX 处理组见图 1 注。

图 5 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白表观黏度的影响

Fig.5 Effect of porphyrins and free iron on the apparent viscosity of myofibrillar protein



A: 弹性模量; B: 黏度损耗模量。Fresh 处理组、Heat 处理组、Tris 处理组、PPIX 处理组、Hemin 处理组、FeCl₃ 处理组见图 1 注。

图 6 卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白动态流变的影响

Fig.6 Effect of porphyrins and free iron on dynamic rheology of myofibrillar protein

热后提取肌原纤维蛋白,分别测定其聚集特性、氧化特性和流变特性,探究卟啉类化合物影响肉品品质的原因。结果显示,卟啉铁和游离铁使鸡胸肉肌原

纤维蛋白氧化程度显著增加,蛋白质交联聚集,但原卟啉对肌原纤维蛋白的氧化作用相对较小;原卟啉、卟啉铁和游离铁可使鸡胸肉肌原纤维蛋白的离子键

和氢键含量降低,疏水相互作用力和二硫键含量增加;由 SDS-PAGE 条带可知,原卟啉、卟啉铁和游离铁均可引起肌动球蛋白解离,并且卟啉铁的作用效果最强;由表观黏度和动态流变结果可知,游离铁和卟啉铁处理后鸡胸肉肌原纤维蛋白的黏度降低,凝胶结构受到破坏,而原卟啉更有利于维持肌原纤维蛋白稳定的凝胶结构或网络结构。卟啉类化合物和游离铁对肌原纤维蛋白结构的改变和对肌动球蛋白的解离作用可能是引起鸡肉嫩度改变的原因,但仍需进一步明确卟啉类化合物与肌原纤维蛋白相互作用的机制,为贮藏和加工过程中鸡肉品质的形成提供理论依据。

参考文献:

- [1] 韩 格,孔保华. 功率超声对肌原纤维蛋白功能特性及肉品品质的影响研究进展[J]. 食品科学,2022(13):361-369.
- [2] 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.
- [3] XIONG Q, ZHANG M H, WANG T, et al. Lipid oxidation induced by heating in chicken meat and the relationship with oxidants and antioxidant enzymes activities[J]. Poultry Science, 2020, 99(3):1761-1767.
- [4] ZHANG Y F, TIAN X J, JIAO Y Z, et al. Free iron rather than heme iron mainly induces oxidation of lipids and proteins in meat cooking[J]. Food Chemistry, 2022, 382:132345.
- [5] ZHANG M H, BIAN H, LI J L, et al. Comparison of biochemical characteristics and gel properties of chicken myofibrillar protein affected by heme-iron and nonheme-iron oxidizing systems[J]. Food Research International, 2023, 165:112538.
- [6] 舒丽枝,张牧焱,徐为民,等. 卟啉类化合物对鸡胸肉品质的影响[J]. 食品研究与开发,2023,44(7):24-29.
- [7] TAN F J, LAI K M, HSU K C. A comparative study on physical properties and chemical interactions of gels from tilapia meat pastes induced by heat and pressure[J]. Journal of Texture Studies, 2010, 41(2):153-170.
- [8] NAWAZ A, IRSHAD S, KHAN I A, et al. Protein oxidation in muscle-based products: effects on physicochemical properties, quality concerns, and challenges to food industry[J]. Food Research International, 2022, 157:111322.
- [9] WANG H H, SONG Y Y, LIU Z Q, et al. Effects of iron-catalyzed and metmyoglobin oxidizing systems on biochemical properties of yak muscle myofibrillar protein[J]. Meat Science, 2020, 166:108041.
- [10] FU Q Q, LIU R, WANG H O, et al. Effects of oxidation *in vitro* on structures and functions of myofibrillar protein from beef muscles[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(20):5866-5873.
- [11] ZHU X S, SHI X D, LIU S H, et al. Physicochemical properties and gel-forming ability changes of duck myofibrillar protein induced by hydroxyl radical oxidizing systems[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9:1029116.
- [12] LUND M N, HEINONEN M, BARON C P, et al. Protein oxidation in muscle foods: a review[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(1):83-95.
- [13] MCMICKEN B, THOMAS R J, BRANCALEON L. Erratum: photoinduced partial unfolding of tubulin bound to meso-tetrakis (sulfonatophenyl) porphyrin leads to inhibition of microtubule formation *in vitro*[J]. Journal of Biophotonics, 2013, 6(11/12):968.
- [14] NUNEZ-FLORES R, CANDO D, BORDERIAS A J, et al. Importance of salt and temperature in myosin polymerization during surimi gelation[J]. Food Chemistry, 2018, 239:1226-1234.
- [15] WANG L M, WANG X, MA J, et al. Effects of radio frequency heating on water distribution and structural properties of grass carp myofibrillar protein gel[J]. Food Chemistry, 2021, 343:128557.
- [16] 杨 天,耿文豪,郑志红,等. 褐藻寡糖对鲢鱼鱼糜稳定性、分子间作用力及肌原纤维蛋白结构的影响[J]. 肉类研究, 2021, 35(7):1-8.
- [17] ZHANG Y J, LI X, ZHANG D Q, et al. Effects of acetylation on dissociation and phosphorylation of actomyosin in postmortem ovine muscle during incubation at 4 °C *in vitro* [J]. Food Chemistry, 2021, 356(Suppl C):129696.
- [18] XUE C, YOU J, XIONG S B, et al. Myosin head as the main off-odors binding region: key binding residues and conformational changes in the binding process[J]. Food Chemistry, 2023, 403:134437.
- [19] PONGSAWATMANIT R, SRIJUNTHONGSIRI S. Influence of xanthan gum on rheological properties and freeze-thaw stability of tapioca starch[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 88(1):137-143.
- [20] 李 可,李 燕,康超娣,等. 常压等离子体射流对鸡肉肌原纤维蛋白结构和流变特性的影响[J]. 食品科学,2020,41(19):124-131.
- [21] KIM T, LEE M H, YONG H I, et al. Impacts of fat types and myofibrillar protein on the rheological properties and thermal stability of meat emulsion systems[J]. Food Chemistry, 2021, 346:128930.
- [22] VISESSANGUAN W, OGAWA M, NAKAI S, et al. Physicochemical changes and mechanism of heat-induced gelation of arrowtooth flounder myosin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(4):1016-1023.
- [23] 许时慧,陈金玉,关文强,等. 花生分离蛋白酶解物对鸡肉肌原

- 纤维蛋白流变性的影响[J]. 食品研究与开发,2022,43(5):14-20.
- [24] WANG H F, YANG Z, YANG H J, et al. Comparative study on the rheological properties of myofibrillar proteins from different kinds of meat[J]. LWT,2022,153:112458.
- [25] 魏苏萌,游 远,杨玉玲,等. 氧化对肌原纤维蛋白流变学特性及结构的影响[J]. 食品工业科技,2019,40(9):29-33.
- [26] OOIZUMI T, XIONG Y. Hydroxyl radical oxidation destabilizes subfragment-1 but not the rod of myosin in chicken myofibrils[J]. Food Chemistry,2008,106(2):661-668.

(责任编辑:陈海霞)