

牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶的 分离及其酶学性质

Purification and characterization of metmyoglobin reductase in beef longissimus muscle

赵莉君¹ 赵珂² 赵改名¹ 马阳阳¹

ZHAO Li-jun¹ ZHAO Ke² ZHAO Gai-ming¹ MA Yang-yang¹

朱瑶迪¹ 李苗云¹ 黄明远¹

ZHU Yao-di¹ LI Miao-yun¹ HUANG Ming-yuan¹

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002; 2. 舞钢市防震减灾中心, 河南 舞钢 462599)

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2. Earthquake Prevention and Disaster Mitigation Center in Wugang City, Wugang, Henan 462599, China)

摘要:以冷鲜牛背最长肌为原料,采用硫酸铵盐析、超滤法对原料肉中的高铁肌红蛋白还原酶进行粗分离,并研究温度、pH、金属离子对高铁肌红蛋白还原酶活性的影响。结果表明:在硫酸铵饱和度 65%,超滤(>50 kDa)条件下,牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶可得到分离与纯化。试验范围内,牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶的分子量为 29.0~66.4 kDa,适宜温度为 40 ℃,pH 为 6.0,Cu²⁺ 可明显抑制牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶活性。

关键词:背最长肌;高铁肌红蛋白还原酶;分离纯化;酶学性质

Abstract: The longissimus muscle from chilled beef was used as raw material to preliminary study the purification and characteristics of metmyoglobin reductase. The effect of temperature, pH and metal ions on the metmyoglobin reductase activity was investigated. Results revealed that the metmyoglobin reductase of longissimus muscle could be crudely purified with ammonium sulfate (65% saturation) and ultrafiltration (>50 kDa). SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight of the metmyoglobin reductase of longissimus muscle was 29.0~66.4 kDa, mainly. The proper temperature of the metmyoglobin reductase of longis-

simus muscle was 40 ℃, with the proper pH 6.0. Cu²⁺ could inhibit the activity of the metmyoglobin reductase obviously.

Keywords: longissimus muscle; metmyoglobin reductase; purification; enzyme properties

冷鲜牛肉营养丰富,味道鲜美,在满足人们对美食需求的同时,给人体健康带来诸多益处,是牛肉消费的主要形式^[1-2]。然而,冷鲜牛肉在运输和贮藏过程中出现的颜色劣变问题极大地影响了其销售,制约了其发展。研究^[3-5]表明,影响冷鲜牛肉色泽稳定性的因素包括品种、部位、温度、pH、脂质过氧化、微生物、肌红蛋白的状态及高铁肌红蛋白还原酶的活性等。其中,氧合肌红蛋白呈鲜红色,高铁肌红蛋白呈棕褐色,肌细胞内部存在的高铁肌红蛋白还原酶能将高铁肌红蛋白还原成氧合肌红蛋白,从而稳定肉色,延长其货架期^[5-7]。就不同部位冷鲜肉而言,贮藏过程中,背最长肌的色泽稳定性相对较好。

近年来,有关高铁肌红蛋白还原酶的研究报道较多,但涉及其分离纯化和性质研究的相对较少。研究^[8-10]表明,不同种类的肉、同一种类不同部位的肉,高铁肌红蛋白还原酶间存在差异。试验拟以冷鲜牛背最长肌为原料,采用硫酸铵盐析、超滤的方法,对其高铁肌红蛋白还原酶进行粗分离,并对高铁肌红蛋白还原酶的适宜温度、pH 等进行研究,以期冷鲜牛肉色泽稳定性的提高提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

牛背最长肌:夏南牛,郑州市天明路黄家牛肉超市;

基金项目:国家肉牛牦牛产业技术体系(编号:CARS-37);河南农业大学科技创新基金项目(编号:KJCX2020A17);河南省自然科学基金(基础与前沿技术)研究项目(编号:152300410068);河南农业大学博士科研启动基金项目(编号:30600779)

作者简介:赵莉君,女,河南农业大学讲师,博士。

通信作者:李苗云(1976—),女,河南农业大学教授,博士。

E-mail:limy7476@126.com

收稿日期:2019-11-14

透析袋:截留分子量 10 kDa,北京博奥拓达科技有限公司;

超滤膜:分子量 50,30,10 kDa,上海摩速科学器材有限公司;

马骨骼肌肌红蛋白标准品:北京索莱宝科技有限公司;

硫酸铵、磷酸、铁氰化钾等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:AL104 型,梅特勒-托利多(上海)有限公司;

台式冷冻离心机:Multifuge X1R 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

恒温水浴锅:HH-601A 型,金坛市国旺实验仪器厂;

超滤杯:MILLIPORE 8050 型,上海摩速科学器材有限公司;

磁力搅拌器:JB-1A 型,上海雷磁仪器厂;

电泳仪:DYY-5 型,北京六一仪器厂;

紫外检测仪:HD-21-2 型,上海青浦浦西仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 高铁肌红蛋白还原酶粗酶液的提取 参照高娜等^[11-12]的方法并稍作改进。肉样切小块去筋膜,搅碎。每组取 5 g 样品并加入 20 mL 磷酸缓冲液。经高速分散器匀浆处理后,4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min,上清液用中速定性滤纸过滤掉多余脂肪。用稍过量的铁氰化钾(3.0 mmol/L)氧化滤液中的氧合肌红蛋白,至滤液由鲜红色变为褐色。将滤液装入分子量 10 kDa 的透析袋,于磷酸缓冲液中透析除盐 24 h(每 5 h 换一次透析液),4 ℃、10 000 r/min 离心 30 min,取上清液,用磷酸缓冲液定容至 25 mL,即制得粗酶液。

1.2.2 高铁肌红蛋白还原酶酶活性的测定 参照文献^[6,11-12]的方法并稍作改进。反应温度 25 ℃,反应前 25 min 将各组分放置于 25 ℃ 水浴锅中水浴加热。加入还原型辅酶 I 后,启动反应,测定 580 nm 处吸光值,每隔 10 s 记录一次数据。

1.2.3 硫酸铵盐析 参照文献^[13]的方法并稍作改进。取粗酶液,边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至 55% 饱和度,磁力搅拌 20 min,冰浴静置 2 h,4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min;取上清液,边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至 60% 饱和度,重复上述操作,最终得到粗酶液在 55%,60%,65%,70% 的硫酸铵饱和度下的分级沉淀物;将沉淀分别溶于磷酸缓冲液,于 4 ℃ 充分透析脱盐,测定蛋白含量和高铁肌红蛋白还原酶酶活。

1.2.4 超滤 参照文献^[13]的方法并稍作改进。在 1.2.3 的基础上,将具有高活性高铁肌红蛋白酶活的目标样液用微孔滤膜(0.45 μm)过滤去除不溶性杂质,将滤液加冰磷酸盐缓冲液(2.0 mmol/L, pH 7.0)稀释,于氮气压力

1.0 MPa,120 r/min 下分别用 50,30,10 kDa 膜进行超滤,测定蛋白含量和高铁肌红蛋白还原酶酶活。

1.2.5 蛋白质含量的测定 采用 Bradford 法^[13]。取 5 mL 过滤后的考马斯亮蓝染液,加入待测样液 1 mL,5 min 后测定 595 nm 处吸光度,并将其代入标准曲线计算蛋白质浓度。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳 参照 SDS-PAGE 电泳标准操作流程^[13]。其中,使用 5% 浓缩胶和 12% 分离胶,Marker 的分子量为 6.5~200.0 kDa,对 MetMbR 酶的粗提取液及各纯化阶段酶液进行 SDS-PAGE 电泳试验。

1.2.7 适宜温度、pH 等的测定

(1) 最适温度:按 1.2.2 的方法将整个反应体系组分分别置于 20,30,40,50 ℃ 下反应,测定高铁肌红蛋白还原酶活性。

(2) 最适 pH:按 1.2.2 的方法将整个反应体系组分分别于 pH 5.0,6.0,7.0,8.0 下反应,测定高铁肌红蛋白还原酶活性。

(3) 金属离子:按 1.2.2 的方法在反应体系中分别以不同离子浓度(0.5,1.0,5.0 mmol/L)的 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 金属离子替代 EDTA,同时以去离子水作为空白对照,测定不同金属离子下高铁肌红蛋白还原酶活性变化。

1.2.8 数据处理 采用 Excel 2010 和 SPSS 16.0 软件对试验数据进行整理和分析。

2 结果与分析

2.1 牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶的粗分离

2.1.1 硫酸铵盐析 夏南牛牛背最长肌粗酶液中高铁肌红蛋白还原酶的酶活为(89.0±1.4) U/mL。硫酸铵盐析法常用来进行酶的粗分离,其操作简便,效果好^[14]。由表 1 可知,当硫酸铵饱和度为 65% 时,高铁肌红蛋白还原酶活性较高,即当硫酸铵饱和度为 65% 时,可主要沉淀得到高铁肌红蛋白还原酶,实现粗分离。

2.1.2 超滤 超滤是常用的膜分离技术之一,其以压差为推动力,根据超滤膜截留分子量的不同,可用于对酶的粗分离与纯化^[15]。由表 2 可知,>50 kDa 超滤膜截留液

表 1 不同硫酸铵饱和度下牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶酶活

Table 1 The metmyoglobin reductase activity of longissimus muscle under different ammonium sulfate saturation

硫酸铵饱和度/%	高铁肌红蛋白还原酶活性/(U·mL ⁻¹)
55	2.1±1.4
65	48.0±2.1
75	11.9±3.3
85	7.0±1.9

中所获得的高铁肌红蛋白还原酶活性较高,可取该部分经粗分离与纯化的截留液进行后续分析。

由表 3 可知,牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶经硫酸铵盐析、超滤后,得到了一定程度的粗分离与纯化。

2.1.3 SDS-PAGE 电泳 由图 1 可知,牛背最长肌粗酶液中的蛋白分子量为 14.3~97.2 kDa,经硫酸铵盐析、超滤初分离后,提取物中的蛋白分子量为 29.0~66.4 kDa。经硫酸铵盐析、超滤后,牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶虽得到了部分分离与纯化,但粗酶液中还含有大量其他杂蛋白。若需对牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶进行进

表 2 不同超滤截留液中牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶酶活

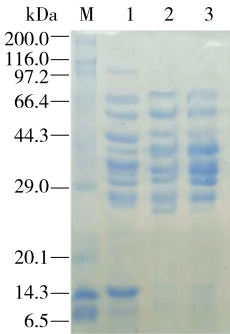
Table 2 The metmyoglobin reductase activity of longissimus muscle under different ultrafiltration

超滤膜分子量/kDa	高铁肌红蛋白还原酶活性/(U · mL ⁻¹)
<10	—
10~30	—
30~50	2.8±0.9
>50	40.0±1.2

表 3 分步提取物中牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶酶活

Table 3 The metmyoglobin reductase activity of longissimus muscle under different purification

步骤	高铁肌红蛋白还原酶活性/(U · mL ⁻¹)	蛋白浓度/(mg · mL ⁻¹)	比活力/(U · mg ⁻¹)	纯化倍数	得率/%
粗酶液	89.0	6.13	14.52	1.00	100.00
硫酸铵盐析	48.0	2.85	16.84	1.16	54.93
超滤	40.0	2.28	17.54	1.21	44.94



M. Marker 1. 粗酶液 2. 65%硫酸铵盐析 3. >50 kDa 超滤

图 1 SDS-PAGE 电泳图

Figure 1 SDS-PAGE electrophoretogram

一步细分离与纯化,还需通过凝胶过滤层析或离子交换层析、亲和层析等技术得以实现^[16-17]。

2.2 牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶的酶学性质

2.2.1 最适温度 由表 4 可知,温度对牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶活性影响显著(P<0.05),随着温度的升高,牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶活性先上升后下降。当温度为 40 ℃时,牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶活性最高。Mikkelsen 等^[18]发现牛心肌高铁肌红蛋白还原酶活性随温度的升高而升高,直至温度为 30 ℃;Echevarne 等^[19]发现牛骨骼肌高铁肌红蛋白还原酶最适温度为 37.5 ℃,且当温度为 10 ℃以下和 50 ℃以上时活性极小。综上,温度对高铁肌红蛋白还原酶活性有较大影响。

2.2.2 最适 pH 由表 5 可知,pH 对牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶活性影响显著(P<0.05),牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶活性的适宜 pH 为 6.0。Hagler 等^[8]发

表 4 温度对牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶酶活的影响[†]

Table 4 Effect of temperature on the metmyoglobin reductase activity

温度/℃	高铁肌红蛋白还原酶活性/(U · mL ⁻¹)
20	36.2±1.7 ^c
30	48.6±1.2 ^b
40	63.0±1.4 ^a
50	50.1±0.6 ^b

[†] 字母不同表示差异显著(P<0.05)。

表 5 pH 对牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶酶活的影响[†]

Table 5 Effect of pH on the metmyoglobin reductase activity

pH	高铁肌红蛋白还原酶活性/(U · mL ⁻¹)
5.0	71.5±1.3 ^b
6.0	93.9±1.6 ^a
7.0	43.0±0.8 ^c
8.0	37.2±1.1 ^d

[†] 字母不同表示差异显著(P<0.05)。

现牛心肌中 MetMbR 的最适 pH 为 6.5,高娜等^[11]研究表明牦牛背最长肌在 pH 7.0 时 MetMbR 酶活最高,Zhu 等^[20]也发现 pH 值对 MetMbR 的还原作用影响显著。

2.2.3 金属离子 由表 6 可知,5 种金属离子(Mn²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺)对高铁肌红蛋白还原酶酶活呈抑制作用,其中 Cu²⁺ 的抑制作用尤为明显,与王玮^[9]的研究结论一致。

表 6 金属离子对牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶酶活的影响[†]
Table 6 Effect of metal ions on the metmyoglobin reductase activity

离子浓度/ (mmol · L ⁻¹)	高铁肌红蛋白还原酶活性/(U · mL ⁻¹)				
	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cu ²⁺
空白	40.2±0.1	40.2±0.1	40.2±0.1	40.2±0.1	40.2±0.1
0.5	37.3±1.3	34.0±0.8	34.4±2.8	37.0±1.6	0.1±0.0
1.0	27.1±1.3	25.2±1.2	27.0±1.4	41.0±1.4	0.1±0.0
5.0	29.0±1.4	—	25.1±1.2	30.0±0.9	—

[†] “—”表示溶液中出现明显沉淀,蛋白变性,未检测。

3 结论

对牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶进行了粗分离。结果表明,牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶酶活为 89.0 U/mL。经硫酸铵盐析(硫酸铵饱和度为 65%)、超滤(>50 kDa),可使得牛背最长肌中高铁肌红蛋白还原酶实现粗分离。SDS-PAGE 电泳表明,牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶的纯化效果并不理想,若要得到电泳纯的高铁肌红蛋白还原酶,还需在后续研究中通过凝胶过滤层析、离子交换层析或亲和层析等技术实现。粗分离所得的牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶分子量为 29.0~66.4 kDa,最适温度为 40 ℃,最适 pH 为 6.0。此外,金属离子(Mn²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺)对牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶活性有抑制作用,其中 Cu²⁺ 的抑制作用最明显。

参考文献

[1] DARIO P, ADRIANA P, CHAMORRO V, et al. A contribution of beef to human health: A review of the role of the animal production systems[J]. The Scientific World Journal, 2016, 2 016: 1-10.

[2] 张杏亚, 李姣, 李亚蕾. 冷鲜牛肉复合保鲜剂的筛选与优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 185-190.

[3] 魏燕超, 曹建听, 刘满顺, 等. 陕西特色牛、羊肉食用品质及蛋白稳定性研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(9): 30-35.

[4] 李升升, 靳义超, 闫忠心. 运输温度对牦牛肉品质的影响及其相关性分析[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 143-146.

[5] BEKHIT A E D, GEESINK G H, MORTON J D, et al. Metmyoglobin reducing activity and colour stability of ovine longissimus muscle [J]. Meat Science, 2001, 57 (4): 427-435.

[6] 谢丽, 高晓光, 苗敬, 等. 牛不同部位肌肉高铁肌红蛋白还原酶活力及耗氧率对肉色稳定性的影响[J]. 食品工业科技, 2012(16): 342-346.

[7] 张同刚, 罗瑞明, 李亚蕾, 等. 基于拉曼光谱法测定冷鲜牛肉中肌红蛋白相对含量[J]. 食品科学, 2018, 39 (2): 210-214.

[8] HAGLER L, COPPES R I, HERMANR H. Metmyoglobin

reductase: Identification and purification of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from bovine heart which reduces metmyoglobin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1979, 254(14): 6 505-6 514.

[9] 王玮. 高铁肌红蛋白还原酶分离纯化及表征[D]. 南京: 南京师范大学, 2009: 1-6.

[10] PONG C Y, CHIOU T K, NIEH F P, et al. Purification and characterization of metmyoglobin reductase from ordinary muscle of blue-fin tuna [J]. Fisheries Science, 2001, 66(3): 599-604.

[11] 高娜, 张玉斌, 韩玲, 等. 牦牛背最长肌高铁肌红蛋白还原酶提取工艺的优化[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 94-98.

[12] REDDY L M, CARPENTER C E. Determination of metmyoglobin reductase activity in bovine skeletal muscles[J]. Journal of Food Science, 1991, 56(5): 1 161-1 164.

[13] 伯吉斯, 陈薇. 蛋白质纯化指南[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2013: 383-387.

[14] 宁校平, 陈文清. 硫酸铵盐析法提高 β-葡萄糖苷酶活探究实验[J]. 四川化工, 2016, 19(2): 17-19.

[15] 刘彬, 曹栋, 孟庆然. 超滤技术结合大孔吸附树脂纯化低聚果糖[J]. 食品与机械, 2016, 32(2): 133-138.

[16] 张雪, 华霄, 许琪, 等. 低温 β-半乳糖苷酶分离纯化及酶学性质研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 174-178.

[17] 邓波, 邓放明. 藕带过氧化物酶的分离纯化及酶学性质[J]. 食品与机械, 2016, 32(2): 20-23.

[18] MIKKELSEN A, JUNCHER D, SKIBSTED LH. Metmyoglobin reductase activity in porcine m. longissimus dorsi muscle[J]. Meat Science, 1999, 51(2): 160-161.

[19] ECHEVARNE C, RENERRE M, LABAS R. Metmyoglobin reductase activity in bovine muscles[J]. Meat Science, 1990, 27(2): 161-172.

[20] ZHU L G, BREWER M S. Effects of urea denaturation and pH on the ability of porcine myoglobin to undergo reduction[J]. Meat Science, 2003, 63(4): 430-432.