



亚硝基血红蛋白的组成与功能

——兼与酪蛋白和大豆分离蛋白作比较

施春权, 孔保华, 张天琪, 邢绍平
(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 本试验用新鲜猪血细胞为原料合成的亚硝基血红蛋白, 并对产品进行真空冷冻干燥, 研究了亚硝基血红蛋白粉末中的亚硝酸钠、蛋白质含量以及氨基酸种类及含量。结果表明, 蛋白粉末中的亚硝酸钠含量为4.20mg/kg、蛋白质含量为93.65%、氨基酸总量为78.37%、铁含量为0.03%; 同时, 还对蛋白粉末的溶解性、乳化性和持水持油性进行研究, 并与大豆分离蛋白和酪蛋白进行比较, 结果表明亚硝基血红蛋白具有较好的溶解性能、持水性能与持油性, 但乳化性较差。

关键词: 亚硝基血红蛋白; 组成; 功能性质; 比较

Composition and Function of Nitrosohemoglobin

——and Comparison with Casein and Soy Protein Isolate

Shi Chun-quan, Kong Bao-hua, Zhang Tian-qi, Xing Shao-ping
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, china)

Abstract: The compositions of nitrosohemoglobin, including the content of nitrite, the content of protein and the variety and the amount of amino acid and the content of iron have been determined in this review. The result showed that the content of nitrite is 4.20mg/kg, the content of protein is 93.65%, the amount of amino acid is 78.37% and the content of iron is 0.03%. At same time, nitrogen solubility index, emulsifying activity index, water holding capacity and oil holding capacity of nitrosohemoglobin were determined compared to casein and soy protein isolate's. The result indicated that solubility, water holding capacity and oil holding capacity were excellent but emulsifying activity was not good as casein and soy protein isolate's.

Key words: Nitrosohemoglobin, Composition, Functional properties, Comparison

中图分类号: TS202 文献标志码: A 文章编号: 1001-8123(2008)07-0030-05

亚硝酸盐在肉制品加工中作为腌制剂的主要成分发色剂被广泛使用, 由于其毒性和生成的亚硝胺的强烈致癌性, 人们一直致力于寻找替代亚

硝酸盐的方法^[1]。在亚硝酸盐的替代方法研究中, 以血红蛋白为原料生产亚硝基血红蛋白是充分利用畜禽血资源和降低肉制品中亚硝酸盐残留量的

收稿日期: 2008-08-03

基金项目: 黑龙江省十一五科技攻关重点项目, 项目编号: GB06B403

作者简介: 施春权 (1978-), 男, 东北农业大学 食品科学硕士, 研究方向畜产品加工。

通讯作者: 孔保华 E-mail: kongbh63@hotmail.com

有效途径^[2]。但国内外科研人员对其的组成及功能性质鲜有研究,蛋白质的大多数功能性质影响着食品的感官品质,尤其是在质地方面,也能对食品成分制备、加工和贮存过程中的物理特性起主要作用,是决定蛋白质利用价值大小的关键因素^[3],尤其溶解性、持水、持油性决定一种添加剂应用的方式方法。因此本文着重研究了亚硝基血红蛋白的溶解性、乳化性以及持水、持油性,并与酪蛋白和大豆分离蛋白功能性质作比较,以期亚硝基血红蛋白应用在方式方法方面提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜猪血:购于东北农业大学附近市场,猪屠宰后立即对血液进行顺时针搅拌防止其凝固,经罐装后运回实验室,整个过程不超过5h;其它化学试剂均为分析纯。

酪蛋白:山东万得福实业集团提供,蛋白含量82.6%。

大豆分离蛋白:临夏州华安生物制品有限责任公司提供,蛋白含量94.9%。

1.2 主要仪器与设备

AL104精密电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)、DELTA320pH计(梅特勒-托利多仪器有限公司)、LG10-24A高速离心机(北京医用离心机厂)、721分光光度计(山东高密彩虹仪器有限公司)、LGJ-1冷冻干燥机(上海医用分析仪器厂)、LC-10AS氨基酸自动分析仪(日本岛津公司)、FOSS-2300全自动凯氏定氮仪、JJ-1精密增力电动搅拌器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)、XHF-1型内切式匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 亚硝基血红蛋白的制备

将新鲜猪血置于桶中,顺时针搅拌,使血中的纤维蛋白完全分离出来,从而避免了血的凝结。然后将新鲜猪血放在离心机中,在4000r/min的条件下离心20min,将上层的血清蛋白和中层的血纤维等物质除去得到下层的蛋白。取一定量的血红蛋白加入等体积的水,同时加入血细胞中血红素至4倍的亚硝酸钠和血红素质量4倍的抗坏血酸,在搅拌器上搅拌10min,使血红蛋白完全进入水相。用1mol/LHCl和1mol/LNaOH调节溶液的pH为6.0之后,将血红蛋白溶液放在80℃水浴锅中水浴25min,使血红蛋白在抗氧化剂抗坏血酸的保护之下完全与亚硝酸钠反应,生成亚硝基血红蛋白,反

应之后将生成的亚硝基血红蛋白溶液迅速冷却至室温,并在3000r/min的条件下离心15min,使亚硝基血红蛋白固体沉积于离心管底部,残余的亚硝酸钠等盐类物质完全进入上层的水相,除去上层的水相,将得到的亚硝基血红蛋白放置于冷冻干燥机中进行冻干,最后亚硝基血红蛋白成粉末状,装入封口袋放入冰柜进行避光避氧保存。

1.3.2 蛋白质含量的测定

凯氏定氮法(GB/T 5009.33-2003)。

蛋白质含量计算公式:

$$X(\%) = \frac{m \times 0.001 \times F}{M} \times 100$$

式中: X 为蛋白质含量(%); m 为测定样中氮总量(mgN); M 为样品质量(g); F 为氮换算为蛋白质的系数,肉制品为6.25。

1.3.3 氨基酸含量的测定

氨基酸自动分析法(GB/T5009.124-2003)。

具体方法如下:取一定量样品(约含蛋白质15mg左右)于试管中,加6mol/L的盐酸15mL,加入新蒸馏的苯酚3~4滴,将试管放入冷冻剂中,冷冻3~5min,抽真空,冲入氮气,重复三次。放在110℃的恒温干燥箱中,水解22h,取出冷却。水解液过滤后,将水解液全部移到5mL容量瓶中用去离子水定容。吸取滤液1mL于5mL容量瓶内,用真空干燥器干燥两次,最后蒸干,用1mLpH2.2的柠檬酸缓冲液溶解,上机测定各氨基酸含量。

1.3.4 亚硝基血红蛋白中亚硝酸钠含量的测定

盐酸萘乙二胺法(GB/T 5009.33-2003)。

1.3.5 铁含量的测定

邻二氮菲比色法(GB/T 9695.3-1988)。

1.3.6 亚硝基血红蛋白溶解性的测定

参照Bora(2002)方法进行测定。

样品的溶解性用氮溶解指数(NSI)来评价。配制1%(W/V)样品溶液各25mL,用0.5mol/L HCl或0.5mol/L NaOH溶液分别调pH至3.0、5.0、7.0、9.0、11,磁力搅拌45min后,3000g离心30min,采用双缩脲法测定上清液中的氮含量,沉淀物采用凯氏定氮法。

$$NSI(\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

式中: m 为上清液中氮含量; M 为样品中氮含量。

1.3.7 乳化活性测定

参照Pearce和Kinsella方法(1978)进行测定。

24mL0.1%(W/V)的样品溶液用0.1mol/L HCl或0.1mol/LNaOH分别调pH至3.0、5.0、7.0、9.0后,加入8mL大豆色拉油,剪切乳化仪10000r/min搅打1min,立即于容器底部取样100μL,用0.1%

的SDS溶液稀释一定倍数,混匀后500nm处测定吸光值,以SDS溶液作为空白。乳化活性(EAI)按下式计算:

$$EAI(m^2/g) = \frac{2 \times 2.303 \times A_{500} \times N}{C \cdot \Phi \cdot L \times 10^4}$$

式中: A_{500} 为样液在500nm处的吸光度; C 为样品浓度(g/mL); Φ 为乳化液中油相的比例; L 为比色杯光径; N 为稀释倍数。

1.3.8 持水、持油能力测定

参照Beuchat方法(1977)进行测定。

持水性: 0.5g样品与5g去离子水于离心管中混匀,室温下静置30min后,2000g离心30min,测定上清液质量,体积前后差值即为样品吸水量。持水性以每克样品吸附水的克数表示。

持油性: 0.5g样品与5mL大豆油于离心管中混匀后,2000g离心30min,测定上清液质量,与假如油的质量差值即为样品吸油量。持油性以每克样品吸附油的克数表示。

1.3.9 统计分析

应用statistix 8.1进行数据分析,用Sigmaplot 9.0进行绘图

2 结果与分析

2.1 亚硝酸钠、蛋白质与铁含量的测定

表1 亚硝基血红蛋白粉末中蛋白质与亚硝酸钠含量
Tab.1 The content of protein and nitrite in trosohemoglobin

蛋白名称	亚硝酸钠含量(mg/kg)	蛋白含量(%)	铁含量(%)
亚硝基血红蛋白	60.02±1.27	93.65±0.26	0.03±0.00

2.2 氨基酸含量的测定

表2 亚硝基血红蛋白粉末中氨基酸含量

Tab.2 The varieties and the content of amino acid in nitrosohemoglobin

氨基酸名称	氨基酸含量(mg/100g)	氨基酸名称	氨基酸含量(mg/100g)
天门冬氨酸 Asp	9.23	异亮氨酸 Ile	0.32
苏氨酸 Thr	2.35	亮氨酸 Leu	11.68
丝氨酸 Ser	3.37	酪氨酸 Tyr	1.15
谷氨酸 Glu	7.01	苯丙氨酸PHe	5.49
甘氨酸 Gly	3.89	赖氨酸Lys	6.70
丙氨酸 Ala	6.60	组氨酸His	0.47
胱氨酸 Cis	0.55	精氨酸Arg	6.17
缬氨酸 Val	7.25	脯氨酸Pro	3.04
蛋氨酸 Met	0.63	氨基酸总量TFAA	78.37

在肉制品中,亚硝酸钠的残留量要求低于0.15g/kg,按1%的量添加上述的亚硝基血红蛋白到肉制品中,那么亚硝酸钠的实际残留量为 4.22×10^{-4} g/kg,要比要求残余量低四个数量级,因此应用亚硝基血红蛋白作为肉制品的发色剂可以完全避免亚硝酸盐残余量的超标问题,提高肉制品得起安全性。另外,从表1可以看出,亚硝基血红蛋白粉末中93.65%是蛋白质,应用到肉制品中还可以增加蛋白的含量。同时从表中可以看出亚硝基血红蛋白中铁的含量为0.03%,应用到肉制品中可以提高制品的铁含量,有效地补充人体内的铁缺乏,提高人体机能。

表2说明亚硝基血红蛋白中各种氨基酸的组成情况。亚硝基血红蛋白的氨基酸组成与普通的食物原料,如大豆、牛肉、蛋有很大不同,除异亮氨酸和色氨酸外都显著高于相应的氨基酸含量,与FAO要求比较,只有异亮氨酸、蛋氨酸低于其标准,基本可以满足人体对氨基酸种类及比例的要求。

2.4 溶解性测定

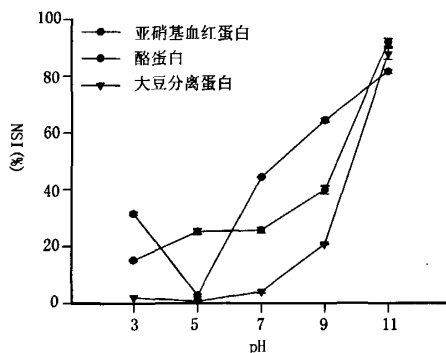


图1 亚硝基血红蛋白与酪蛋白、大豆分离蛋白的pH-NSI曲线

Fig.1 pH-NSI curves of nitrosohemoglobin, casein and soy protein isolate

图1所示为亚硝基血红蛋白及大豆分离蛋白和酪蛋白在不同pH下的溶解性曲线。从图中可以看出,三种蛋白的溶解性受pH的影响非常大。亚硝基血红蛋白在pH3时溶解度最低,为15.17%,这可能与极酸性的条件下(低于4.0)亚硝基血红蛋白结构发生变化而新生成的蛋白在PH3.0处溶解于水的性能低相关。在pH3.0~5.0时,溶解性增加了10.72%,在pH5.0~7.0范围内溶解性变化非常小,为0.62%,在碱性条件下溶解性明显增强,pH11.0时有约92%的蛋白可溶。大豆分

离蛋白与酪蛋白的溶解度曲线类似于亚硝基血红蛋白, 只不过在 pH 5.0 时有最小的溶解度(分别为 0.69%、2.7%), 这是因为 pH 5.0 是在两种蛋白的等电点附近, 蛋白分子之间缺少静电排斥作用, 因而疏水相互作用导致蛋白质的聚集和沉淀^[7]。

2.5 乳化活性测定

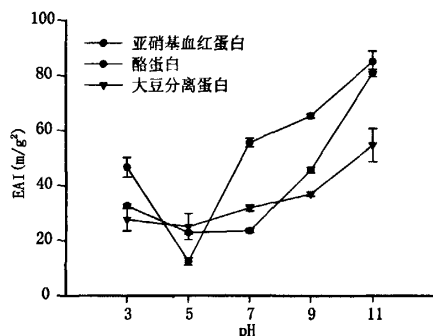


图2 亚硝基血红蛋白与酪蛋白、大豆分离蛋白的 pH-EAI 曲线

Fig.2 pH-EAI curves of nitrosohemoglobin, casein and soy protein isolate

图2所示为亚硝基血红蛋白及大豆分离蛋白和酪蛋白的乳化活性(EAI)随 pH 的变化情况。从图中可看出, 亚硝基血红蛋白在 pH 5.0 时乳化活性较低, 酸性或碱性环境下均增强。其它两种蛋白质的乳化曲线类似于溶解度曲线, 等电点附近乳化活性差, 偏离等电点乳化活性增强。许多食物蛋白的乳化活性均有类似的变化规律。这是因为蛋白质在它的表面性质起作用之前必须先溶解和移动到表面, 不溶性的蛋白对乳化作用的贡献很小, 因此蛋白质的乳化性质和溶解度之间通常呈正相关^{[8][9]}。此外, pH 的改变还直接影响到蛋白质分子的柔性及亲水-亲油性的平衡, 这些因素都与蛋白质的乳化能力是息息相关的^[10]。

2.6 持水、持油能力测定

表3 亚硝基血红蛋白粉末的持水能力

Tab.3 Water-holding capacities of nitrosohemoglobin, soy protein isolate and casein

蛋白种类	1	2	3	4	持水能力 (g/g)
亚硝基血红蛋白	4.77	5.29	5.13	5.07	5.07 ± 0.22 bB
大豆分离蛋白	6.22	6.07	5.93	6.14	6.09 ± 0.12 aA
酪蛋白	2.48	2.38	2.42	2.45	2.43 ± 0.04 cC

注: 大写字母表示在 $P=0.01$ 水平方差分析结果, 小写字母表示 $P=0.05$ 水平方差分析结果, 相同的字母表示差异不显著, 不同的字母表示有差异显著。

表4 亚硝基血红蛋白粉末的持油能力

Tab.4 Oil-holding capacities of nitrosohemoglobin, soy protein isolate and casein

蛋白种类	1	2	3	4	持油能力 (g/g)
亚硝基血红蛋白	3.40	3.12	3.17	3.49	3.30 ± 0.18 aA
大豆分离蛋白	1.37	1.72	1.51	1.63	1.55 ± 0.15 bB
酪蛋白	1.12	1.28	1.23	1.27	1.22 ± 0.08 cC

注: 大写字母表示在 $P=0.01$ 水平方差分析结果, 小写字母表示 $P=0.05$ 水平方差分析结果, 相同的字母表示差异不显著, 不同的字母表示有差异显著。

表3、4所示为亚硝基血红蛋白及酪蛋白、大豆分离蛋白持水/油能力相比较的数据。亚硝基血红蛋白的持水能力为 5.1 g/g。从比较结果来看, 大豆分离蛋白的持水性显著高于亚硝基血红蛋白, 而亚硝基血红蛋白的溶解性又显著高于酪蛋白。一般而言, 蛋白质的溶解性越好, 其持水能力越差^[9]。酪蛋白溶解性很差, 因此有较高的持水能力; 大豆分离蛋白溶解性较差, 所以有较高的持水能力。亚硝基血红蛋白的持油能力为 3.3 g/g。亚硝基血红蛋白的持油能力显著高于大豆分离蛋白的持油能力, 而后的持油能力又显著高于酪蛋白的持油能力。持油性和持水性代表了蛋白质相对立的两个方面的性质。从微观角度讲, 蛋白质的持油性与其分子表面亲脂基团的性质有关^[11], 但越来越多的证据表明物理截留作用对蛋白质的持油能力有最主要贡献^[12]。容积密度越大, 持油能力越小。酪蛋白的容积密度较大, 因此具有较低的持油能力 (1.22 g/g)。

3 结论

亚硝基血红蛋白中蛋白质含量为 93.65%, 氨基酸总量为 78.37%, 并且氨基酸的种类和含量与普通的食物原料, 如大豆、牛肉、蛋有很大不同, 除异亮氨酸和色氨酸外都显著高于相应的氨基酸含量, 因此应用亚硝基血红蛋白至肉制品中可以有效地调整人体部分氨基酸不足, 满足人体的需要; 亚硝基血红蛋白中亚硝钠含量为 4.20 mg/kg, 残留量非常少, 保证了应用后肉制品的安全性, 另外亚硝基血红蛋白中铁的含量为 0.03%, 血液中铁是以二价形式存在的, 利于人体的吸收, 补充人体的铁含量不足, 提高人体机能。

利用氮溶指数法对亚硝基血红蛋白的溶解性进行研究, 并与酪蛋白和大豆分离蛋白的溶解性作比较, 结果表明, 三种蛋白的溶解性受 pH 值影

响很大,但在pH7.0附近,酪蛋白的溶解性要强于亚硝基血红蛋白,而硝基血红蛋白的溶解性要强于大豆分离蛋白。

利用乳化活力指标方法对亚硝基血红蛋白的乳化能力进行研究,并与酪蛋白、大豆分离蛋白的乳化能力进行比较,结果表明,三种蛋白的乳化能力受pH值影响很大,在pH7.0附近酪蛋白的乳化能力要强于大豆分离蛋白的乳化能力,而大豆分离蛋白的乳化能力强于亚硝基血红蛋白的乳化能力。

利用过量水/油法对亚硝基血红蛋白的持水/油性进行研究,并与酪蛋白、大豆分离蛋白的持水/油性进行比较,结果表明,大豆分离蛋白的持水性极显著高于亚硝基血红蛋白的持水性,而亚硝基血红蛋白的持水性及显著高于酪蛋白的持水性;亚硝基血红蛋白的持油能力及显著的高于大豆分离蛋白的持油能力,而大豆分离蛋白的持油能力又极显著的高于酪蛋白的持油能力。

参考文献

- [1] Shahidi F., Ronald B.P., Shamsuzzaman K. Color and Oxidative Stability of nitrite free cured meat after Gamma irradiation[J]. Journal of Food Science, 1991, 56(5): 102-113.
- [2] 杨锡洪. 以血红蛋白制备腌制色素替代亚硝酸钠发色的研究. 2005.
- [3] 李凤霞, 张钟, 刘洪泉. 麻渣蛋白质的制备及其

功能性质的研究[J]. 包装与食品机械, 2007, 25(2): 38-43.

- [4] Bora P. S. Functional properties of native and succinylated lentil (*Lens culinaris*) globulins[J]. Food Chemistry, 2002, 77: 171-176.
- [5] Pearce K.N., Kinsella J.E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of aturbidimetric technique[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1978, 26(3): 716-723.
- [6] Beuchat, I. R. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins[J]. Journal Agricultural and Food Chemistry, 1977, 25: 258-263.
- [7] 王璋, 许时英, 江波, 杨瑞金, 钟芳, 麻建国. 食品化学[M]. 中国轻工业出版社, 2003.
- [8] 赵新淮. 食品化学[M]. 化学工业出版社, 2006.
- [9] 管斌, 林洪, 王广策. 食品蛋白质化学[M]. 化学工业出版社, 2005.
- [10] Nakai S. Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983, 31: 676-680.
- [11] Dedeh S.S., Stanley D. Cowpea protein: use of response surface methodology in predicting cowpea protein extract ability[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1979, 27(6): 1238-1241.
- [12] Wang J.C., Kinsella J.E. Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein[J]. Journal of Food Science, 1976, 41: 286-292.