

猪血中脱色球蛋白的制备及其功能性研究

杨严俊 王荣民

(无锡轻工大学食品学院, 无锡, 214036)

摘要 比较了几种拆分剂分离猪血红细胞中血红蛋白的效果, 其中羧甲基淀粉(CMS)得到最佳效果。脱色球蛋白的功能性实验证实其有良好的起泡和乳化性能, 氨基酸分析显示其赖氨酸和组氨酸的含量较高, 适合作为婴儿的营养强化剂。

关键词 猪血; 血红蛋白; 分离; 脱色球蛋白

中图分类号 TS209

0 前言

猪血中含有 18.9% 的蛋白质。其中 60% 的蛋白质又集中在血液的红细胞中, 尽管红细胞含血液中的大多数蛋白质, 但血红蛋白的深褐色和血腥味为消费者所厌恶而限制了其应用。

最早用酸性丙酮进行脱色实验的是 Jope^[1] 和 Tybor^[2], Sato 发展了一种简单的方法来拆分脱色球蛋白和血红素——即用 CMC 层析柱^[3], 但 1g CMC 只得到 70mg 脱色球蛋白。Autio 使用可溶性 CMC 来拆分牛血红蛋白^[4], 其成本大大低于层析法, 但其缺点是脱色球蛋白中仍然有 0.07% 铁存在, 即大约还有 20% 的血红素铁没有被拆分, 而且 Autio 使用的是纯净的血红蛋白, 未对新鲜血的体系作深入研究, 没有较实用的价值。

作者经筛选确定了粗血红蛋白拆分剂 CMS, 其脱色效果优于上述方法, 并对脱色球蛋白进行了功能性实验。

1 材料与方 法

1.1 材料

1) 粗血红蛋白溶液

制备方法: 新鲜猪血用 0.38% 柠檬酸钠抗凝采集, 6, 3000g 离心 30min 得粗红血球, 加水稀释到 3.8% 待用(加 0.05% NaN₃ 防腐)。

2) 羧甲基淀粉(CMS) 宜兴市变性淀粉厂产品

1.2 主要仪器与设备

收稿日期: 1996-03-21

第一作者: 杨严俊, 男, 1965 年 6 月出生, 博士生 | Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://>

UV-240 紫外扫描分光光度计 日本岛津公司产品

835-50 型氨基酸自动分析仪 日本日立公司产品

1.3 实验方法

1.3.1 拆分剂的选择 离心后制备的粗血红蛋白溶液酸化并用蒸馏水稀释到 1mg/ml , 把用 CMC 和海藻酸钠、CMS 处理过的脱色球蛋白溶液用蒸馏水稀释到 0.37mg/ml 待测。

将以上 4 样品作全波长扫描(从 $700\sim 200\text{nm}$)。

1.3.2 脱色实验 粗血红蛋白 40g , 用 1mol/L HCl 调整 pH 至恰当水平。对照组为经过加热处理(50°C , 30min)的血红蛋白溶液。然后加水至 50g , 搅拌 5min 后, 加入拆分剂, 调整最终 pH 至指定值, 并加水至 100g , 搅拌 20min 后, 4000r/min 离心 10min , 测定上清液(脱色球蛋白溶液)的体积。

蛋白质得率(PR)公式:
$$\text{PR} = \frac{C_s V_s}{C_o V_o} \times 100\%$$

C_s 表示上清液蛋白质浓度($\text{g}/100\text{ml}$), V_s 表示上清液体积(ml), C_o 表示原液的蛋白质浓度($\text{g}/100\text{ml}$), V_o 表示原液体积(ml)。

血红素含量(HC)公式:
$$\text{HC} = (A_s / A_o) \times 100\%$$

A_s 和 A_o 分别表示上清液和粗血红蛋白溶液在蛋白浓度为 1mg/ml 条件下测定的 OD_{388} 的吸收值。

1.3.3 脱色球蛋白的功能性测定

- 1) 起泡性测定(foaming Properties) 按照 Lawhon and cater 的方法^[5]
- 2) 乳化性测定(Emulsification capacity) 按照 tybor 的方法^[6]

1.3.4 氨基酸分析 用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。

2 结果与讨论

2.1 血红蛋白拆分方法及机理的探讨

血红蛋白是血液中红血球的主要成分, 其亚基的立体结构如图 1, 2 所示。

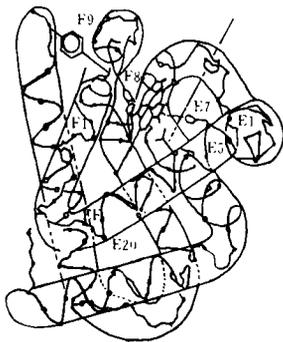


图1 血红蛋白 β 亚基的三级结构

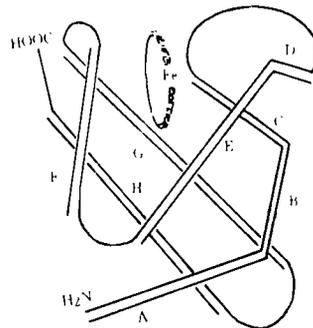


图2 血红蛋白肽链走向

双线表示 α 螺旋

血红素位于 E 和 F 螺旋所构成的疏水的空穴中。因此在正常条件下, 亚铁血红素与蛋白紧紧结合在一起, 很难把它们拆分开来, 但是由于变性因素(如加热、pH 变化、脲、胍等变

性剂)的存在,导致血红蛋白的空间结构发生变化而变性。如 pH 引起的变性是与埋藏在蛋白质分子内部的基团的不稳定性有关。当 $pH < 2.5$ 时,血红蛋白分子中原先不带电荷的埋藏在分子内部的组氨酸残基($PI = 7.00$),由于带有负电荷而暴露出来,同时血红素也被释放出来,并随即氧化成高铁血红素。在此条件下,就有可能使用拆分剂,使高铁血红素和拆分剂发生共沉淀而达到拆分目的。

2.2 拆分及优化实验

使用全波长扫描得到酸化血红蛋白的两个特征吸收峰 OD_{280} 和 OD_{388} , 分别为蛋白特征峰和血红素特征峰。然后在酸性条件下加入拆分剂,使血红素与拆分剂共沉淀,从而达到拆分的目的,并根据 OD_{388}/OD_{280} 比值的大小来甄选拆分剂。结果显示 CMS 具有最好的拆分效果,CMC 次之,海藻酸钠最差。见图 3。

为了准确地测定拆分剂的效果,有必要建立精确的测定方法,脱色是首先考虑的,但是蛋白质的得率对实际生产也十分重要,过低的蛋白得率没有实际意义,即使其血红素含量非常低。因此,用响应值 $R = [HC] \times 10^2 / [PR]^2$ 表示,可较好地评价拆分效果。

实验中使用了 Nakai 1986 年首创的随机质心映射优化程序(RCO)来优化血红蛋白拆分实验。在确定了 3 个主要影响因素,即起始 pH 和拆分剂用量、最终 pH 的搜索范围(见表 1),经过 20 次实验后,得到最佳分离条件,见表 2,3。

经 20 次实验后,CMS 未加热组的优化结果为起始 $pH 0.8 \sim 1.3$,最终 $pH 2.9 \sim 3.2$,CMS 用量在 $30 \sim 40ml$ 。另外从表 2 可见,当起始 $pH < 1.0$ 时,有最好的结果,但由于过酸导致蛋白质发生酸化反应,从而使营养下降。蛋白质的得率也较低。其最终的最佳条件为起始 $pH = 0.9$,最终 $pH = 3.1$,CMS = $40ml$, $R_{min} = 18.4$ (其中 $PR = 51.5\%$, $HC = 4.87\%$)。

CMS 加热组的优化结果,当起始 pH 在 $1.2 \sim 1.5$,最终 $pH 2.2 \sim 2.8$,CMS 用量为 $30 \sim 40ml$ 具有较好的拆分效果。起始 pH 对 CMS 和 HC 没有显著影响,而最终 pH 则对 PR 和 HC 有显著影响,最终 pH 从 $2.2 \sim 2.8$ 时,PR 从 86.4% 降到 65.2% ,而 HC 则从 14.8% 降到 7.39% 。因此,在此体系中,pH 仍然是一个关键因素,其最佳条件为起始 $pH = 1.2$,最终 $pH = 2.8$,CMS = $37.4ml$, $R_{min} = 17.4$ (其中 $PR = 65.2\%$, $HC = 7.39\%$)。

比较加热与未加热体系可以发现,加热后蛋白质的得率比未加热高,但是 Heme 的残留也高,而且加热使起始 pH 提高了 0.3 左右,最终 pH 降低了 0.3 左右。CMS 的用量变化不大,仅下降了 $3ml$ 左右,其最终 R_{min} 仅下降了 1 。加热后最终 pH 对响应值的影响不是很大

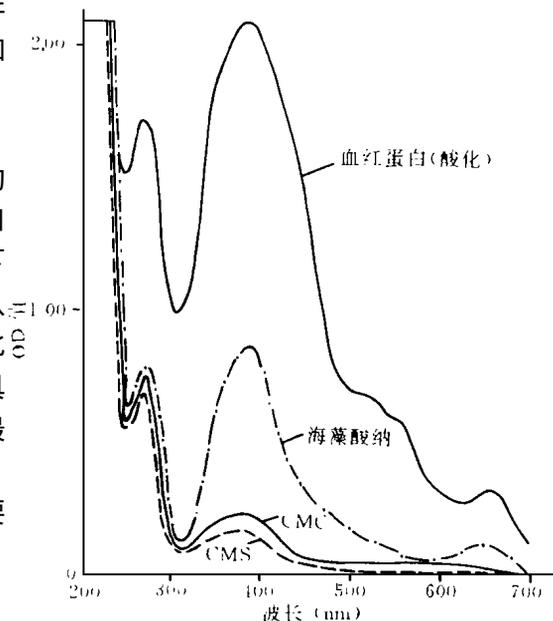


图 3 各种血红蛋白溶液的全波长扫描图

表 1 优化因子及上下限

范围	因素		
	起始 pH	CMS	最终 pH
下限	1.1	10	2.0
上限	2.5	50	4.0

(尽管它对 PR 和 HC 的影响很显著), 因此较易控制, 这对实际生产有重要意义。

表2 未加热组的优化实验

实验号	起始 pH	最终 pH	CMS(ml)	Response
1	1.4	2.5	30.6	39.1
2	2.3	2.2	34.6	54.6
3	2.3	2.4	17.1	40.7
4	1.8	3.7	36.9	123.1
5	2.3	2.6	33.1	63.6
6	1.2	3.0	33.0	30.6
7	1.3	2.2	46.2	47.1
8	1.7	3.9	29.3	154.2
9	1.5	3.5	23.3	77.2
10	1.7	2.6	31.2	56.4
11	1.1	2.7	35.9	45.9
12	1.3	2.6	34.5	27.3
13	1.1	2.6	38.2	30.4
14	1.3	3.2	26.6	37.6
15	1.6	2.4	41.0	35.0
16	1.1	2.9	37.3	20.4
17	1.1	2.9	31.8	29.9
18	1.0	3.0	33.9	20.9
19	0.9	3.1	40.0	18.4
20	0.8	3.2	41.1	20.3

表3 加热组的优化实验

实验号	起始 pH	最终 pH	CMS(ml)	Response
1	1.4	2.5	38.6	38.4
2	2.3	2.2	34.6	72.0
3	2.3	2.4	17.1	80.0
4	1.8	3.7	36.9	125.0
5	1.2	3.0	38.0	39.9
6	1.8	2.2	46.2	79.5
7	1.7	3.9	29.8	122.0
8	1.5	3.5	23.3	101.0
9	1.7	2.6	37.1	40.0
10	1.4	2.7	37.9	34.9
11	1.5	2.5	25.6	28.6
12	1.0	2.4	31.9	23.0
13	1.5	3.1	36.2	37.5
14	1.4	2.3	41.2	25.2
15	1.3	2.9	39.2	25.2
16	1.2	2.8	29.0	24.4
17	1.2	2.2	29.0	23.5
18	1.2	2.2	37.4	19.8
19	1.2	2.8	37.4	17.4
20	2.3	2.6	33.3	84.5

2.3 脱色产品的功能、性质实验

2.3.1 脱色球蛋白的起泡性的测定

- 1) 不同 pH 的脱色球蛋白(1.8g/100ml) 的起泡性与鸡蛋清的起泡性的比较见表 4。
- 2) 不同浓度的脱色球蛋白(pH6.0) 的起泡性与不同浓度鸡蛋清的起泡性的比较见图 4 和图 5。
- 3) 不同 pH 条件下脱色球蛋白起泡性比较见图 6。

表4 脱色球蛋白与鸡蛋清的起泡性比较

样 品	起泡体积(ml)				$\Delta V(\%)$
	V_0	V_2	V_5	V_{10}	
脱色球蛋白(pH2.9)	170	158	152	147	13.5
脱色球蛋白(pH6.0)	183	172	167	165	9.8
脱色球蛋白(pH7.2)	130	117	104	101	22.3
鸡蛋清(13.5g/100ml)	102	100	98	94	7.8
鸡蛋清(6.8g/100ml)	118	102	96	93	21.2

注: V_0 - 起始时间点的起泡体积;

V_2 - 2min 时测定的起泡体积;

V_5 - 5min 时测定的起泡体积;

V_{10} - 10min 时测定的起泡体积;

V 为起泡稳定性指标, $V = \frac{V_0 - V_{10}}{V_0} \times 100\%$.

由图 6 可见, pH 对脱色球蛋白的影响显著, 在 pH6.0 时具有最大的起泡体积, 达 183ml; 而在 7.0 时, 起泡体积最小, 仅 130ml, 而后再缓慢上升。但都超过了鸡蛋清的起泡能力。值得注意的是在最终 pH2.5 ~ 6.0 之间呈现较稳定的起泡能力, 这对生产工艺是合适

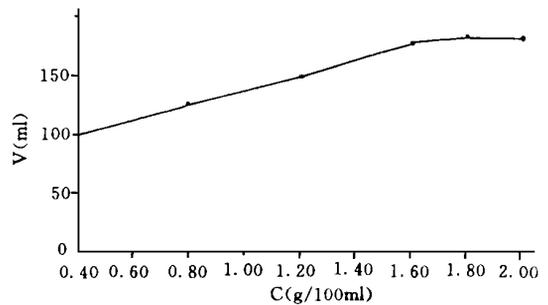


图4 不同浓度的脱色球蛋白起泡能力

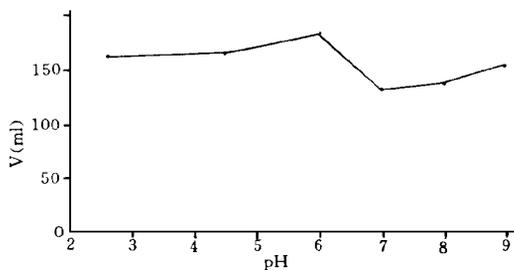
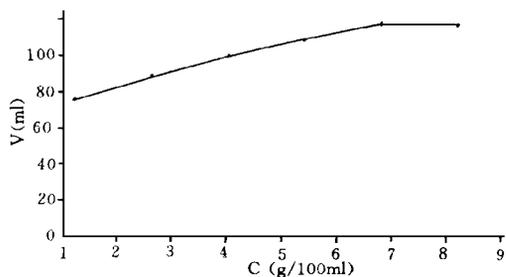


图 5 不同浓度的鸡蛋清的起泡能力

图 6 不同 pH 条件下脱色球蛋白的起泡体积

的。在起泡稳定性方面,鸡蛋清略优于脱色球蛋白(7.8 < 9.8),如图 4 所示,脱色球蛋白在 1.8g/100ml 的浓度时,具有最高的起泡能力,起泡体积达 183ml,而鸡蛋清的最大起泡能力仅为 118ml.

综上所述,脱色球蛋白具有良好的起泡能力,因此它代替鸡蛋清作为食品的起泡剂,预计可得到较好的结果。

2.3.2 脱色球蛋白的乳化性的测定 不同浓度的脱色球蛋白的乳化性能见图 7,当球蛋白的浓度低于 0.3g/100ml 时,只有较低的乳化能力,约 43%。当球蛋白浓度从 0.3g/100ml 上升到 0.4g/100ml 时,乳化能力急剧上升,此后又持续稳定在 82% 左右。

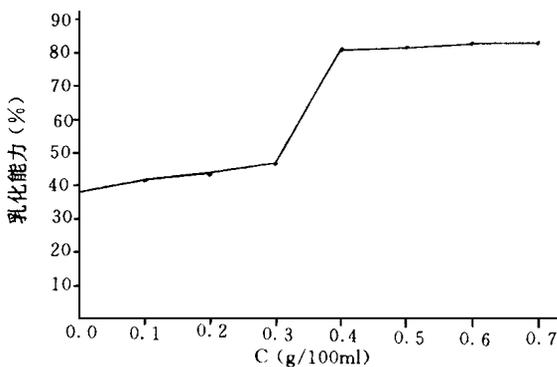


图 7 不同浓度的脱色球蛋白的乳化性能

2.3.3 脱色球蛋白的营养性评价 脱色球蛋白经氨基酸自动分析的结果见表 5. 为了便于比较,还列出 Drankin 法, Sato 法及 FAO 所定人类需要量。由于生产工艺不同,所以氨基酸含量略有不同。

表 5 脱色球蛋白的氨基酸含量 (g/100g)

氨基酸	Hb ⁽¹⁾	脱色球蛋白			FAO 所定人类需要量	
		Drankin ⁽²⁾	Sato ⁽³⁾	CMS 法 ⁽⁴⁾	儿童	成人
Ile(异亮氨酸)	0.58	0.33	0.7	0.45	3.7	1.8
Leu(亮氨酸)	13.36	11.40	13.3	13.65	5.6	2.5
Lys(赖氨酸)	8.26	6.05	8.2	8.25	7.5	2.2
Met(蛋氨酸)	0.92	0.76	1.4	1.29		
Gys(半胱氨酸)	0.73	0.61	0.5	0.55		
含硫氨基酸	1.65	1.37	1.9	1.84	3.4	2.4
Phe(苯丙氨酸)	6.49	5.77	5.4	6.49	3.4	2.5
Tyr(酪氨酸)	2.21	1.70	2.3	1.97		
Thr(苏氨酸)	3.15	2.43	5.4	4.50	4.4	1.3
Trp(色氨酸)	1.90	1.60	ND ⁽⁵⁾	ND ⁽⁵⁾	0.5	0.7
Val(缬氨酸)	8.82	6.94	8.7	7.13	4.1	1.8
His(组氨酸)				9.29		

- 注: (1) Hb- 牛血红蛋白;
 (2) 丙酮法(knappevel 等 1976 年), 产品为牛血脱色球蛋白;
 (3) CMC 法(Sato 等 1981 年), 产品为牛血脱色球蛋白;
 (4) CMS 法(本法), 产品为猪血脱色球蛋白;
 (5) ND- 没有测定.

从表 5 看出, 脱色球蛋白的赖氨酸含量丰富, 因此用脱色球蛋白强化谷类食物可以得到较好的强化效应。另外, 赖氨酸与组氨酸对儿童生长发育具有特别重要的意义。不足之处为异亮氨酸含量太少, 为第一限制氨基酸。因此为了得到更好的营养效果, 应跟含异亮氨酸丰富的其他食品配伍, 提高其生物效价, 以得到最佳效果。

参 考 文 献

- 1 Jope Z M, Jope H M, O'Brien J R P. Crystallizable recombined haeglobin from human red-cell haeglobin. *Nature*. 1949, 164: 622
- 2 Tybor P T, Dill W W, Landman W A. Functional properties of proteins isolated from bovine by a continuous pilot process. *J. Food Sci.* 1975, 40: 355
- 3 Sato Y, Hayakawa S, Hayakawa M. Preparation of Blood globin through carboxymethyl cellulose chromatography. *J. Food Technol.* 1981, 16: 81
- 4 Autio K, Kiesvaara M, Malkki Y. Tapa erottaa veren hemoglobiini hemiksi ja globiini. *Finnish Patent* 1983. 63, 243
- 5 Lawhon J T, Cater C M. Effect of processing method and pH of precipitation on the yields and functional properties of protein isolated from glandless cottonseed. *J. Food Sci.* 1971, 36: 372
- 6 Tybor P T, Dill C W, Landman W A. Effects of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray-dried blood protein concentrates. *J. Food Sci.* 1973, 38: 4

Preparation and Functional Properties of Colorless Globin Derived from Pig Blood

Yang Yanjun Wang Rongming

(School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract The research into the preparation and the functional properties of the colorless globin derived from pig blood is described in the paper. Various reagents were compared for hemoglobin separation from red blood cells. Among them, CMS gave the best results. The functional tests illustrated that colorless globin possesses efficient foaming and emulsifying capacities. The amino acid analysis showed the high levels of lysine and histidine make a potential application for infant nutrition.

Key-words pig blood; hemoglobin; separation; colorless globin