

文章编号:1673-1689(2005)05-0102-05

亚硝酸盐替代物——组氨酸发色作用的研究

杨锡洪, 夏文水*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用组氨酸与血红蛋白形成配位复合物, 替代亚硝酸钠的发色作用. 研究了 pH 对配合物紫外吸收的影响, 计算出配位平衡常数 β , 并通过不同温度下测定 β 值, 求出反应的标准摩尔焓和标准摩尔熵, 表明配位反应是焓、熵降低的过程.

关键词: 血红蛋白-组氨酸配位复合物; 配位平衡常数 β ; 焓; 熵

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

Research on Color Fixation of Histidine as a Substitute for Nitrite

YANG Xi-hong, XIA Wen-shui

(School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Nitrite was substituted by histidine to form ligand complex with hemoglobin for color fixation. pH influence on absorption spectra was studied and the equilibrium constants β was calculated. By detecting absorption at difference temperature, the standard molecular enthalpy change and standard entropy change were calculated, and the results indicated that the reaction was a $\Delta_r H_m^\theta$ and $\Delta_r S_m^\theta$ reducing course.

Key words: hemoglobin-histidine ligand complex; equilibrium constants β ; enthalpy; entropy

亚硝酸盐作为发色剂, 在腌制中降解产生一氧化氮, 与肌红蛋白(紫红色)中血红素的亚铁形成六配位复合物亚硝基肌红蛋白, 加热时不再生成氧化肌红蛋白(褐色). 亚硝酸盐赋予肉制品稳定的腌制红色, 同时具有提高风味、改善质构, 并抑制微生物繁殖等多种功能^[1]. 但由于其毒性和腌制过程中产生的亚硝胺具有致癌性, 因此研究亚硝酸盐的替代方法受到了广泛的关注^[2].

血液是肉类加工的副产品, 含有大量的血红蛋白. 血红蛋白由 4 个亚基组成, 每个亚基都与肌红蛋白具有相似的结构, 即一条珠蛋白链连接一个亚铁血红素, 发色机理相同. 因此, 采用血红蛋白与亚

硝酸盐或一氧化氮反应, 制备亚硝基血红蛋白腌制色素, 然后添加到肉制品中, 可赋予产品理想的色泽, 同时明显降低了产品中亚硝酸钠的残留量^[3]. 目前, 国内外在亚硝基血红蛋白制备条件的优化、微胶囊包埋提高色素的稳定性以及与还原剂、抗菌剂组成多元腌制系统及其应用等方面进行了大量的研究^[3].

为了彻底替代亚硝酸钠, 应选择新的配体与血红蛋白中亚铁血红素配位. 血红素是由四个吡咯分子生成一个卟啉环, 卟啉环的四个氮原子位于同一平面上, 其中两个氮原子与铁原子以共价键结合, 另外两个氮原子则以配位键结合. 铁原子的配位数

收稿日期: 2004-12-01; 修回日期: 2005-01-20.

作者简介: 杨锡洪(1963-), 男, 河北安国人, 副教授, 食品科学与工程博士研究生; * 责任作者.

万方数据

是 6, 第五键与珠蛋白分子的组氨酸残基上咪唑环的氮原子相结合, 发色时即与亚硝基形成六配位复合物^[4,5].

能与血红素中的亚铁形成六配位的配体很多, 如小分子的 O_2 、 CO 、 NO 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH$ 、 $-CN$ 基团, 咪唑、吡啶、噻唑等杂环上的氮原子^[6]. 但是, 选择新配体的原则应是安全、无毒, 且在肉制品加工中被准许使用的天然成分或食品添加剂. 实际上, 能供选择的化合物很少. 有报道用烟酸、烟酰胺和三乙胺与血红蛋白配位制备腌制色素^[7]. 但由于吡啶基团和有机胺类与血红蛋白形成配位化合物的稳定性较差, 应用效果并不理想. 在血红蛋白新的检测方法中, 以咪唑为显色剂, 与血红蛋白可以形成稳定的配位化合物^[8], 因此考虑到组氨酸含有咪唑基, 且在血红蛋白和肌红蛋白中血红素正是与组氨酸残基上的咪唑形成稳定的连接, 本研究中将以组氨酸为替代亚硝酸钠的配体制备无硝色素.

组氨酸广泛存在于蛋白质中, 在蛋白质的结构与功能方面发挥重要的作用^[9], 制备无硝色素所用的组氨酸, 可以取自畜禽血液的酶法水解产物, 原料来源广泛、成本低廉. 由此把畜禽血液的合理利用和安全发色剂的制备相结合, 具有较好的应用前景.

1 材料与方法

1.1 材料

猪血: 无锡肉联厂提供; 组氨酸粗提液: 实验室自制. 采用酶法水解血红蛋白, 水解产物经活性炭脱色, 再用 732 树脂柱吸附, 以 0.05 mol/L 的 NH_4OH 洗脱并收集组氨酸, 组氨酸质量分数约为 2%; 血红蛋白标准品: Sigma 公司产品; 组氨酸标准品、异抗坏血酸钠等为市售分析纯.

1.2 方法

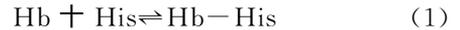
1.2.1 血红蛋白的制备 于收集的新鲜猪血中加入质量分数 0.5% 的柠檬酸钠抗凝, $3\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 收集下部的红血球. 加入等量的生理盐水, 再离心, 去掉上层液, 反复两次. 随后加入 3 倍体积的蒸馏水, 室温下搅拌 30 min, 使红细胞破壁, 释放出血红蛋白. 真空脱气后, 在避光的条件下, 于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 30 min, 取出, $3\ 000 \text{ r/min}$ 离心 15 min, 去除变性的杂蛋白, 得到血红蛋白液.

1.2.2 pH 对组氨酸与血红蛋白配位反应的影响

以血红蛋白标准品配制 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 工作液, 各移 2 mL 于 pH 值分别为 5.0~9.0 的 0.02

mol/L 的 $Na_2HPO_4-KH_2PO_4$ 的缓冲液 7 mL 中, 分别加入浓度为 1 mmol/L 的组氨酸 1 mL, 混匀后在 $500 \sim 600 \text{ nm}$ 范围紫外扫描.

1.2.3 组氨酸与血红蛋白配位复合物的稳定性——配位平衡常数 β 血红蛋白与组氨酸的轴向配位平衡常数 β 采用平衡移动法^[10,11] 测定, 因研究的是组氨酸与亚铁血红素的第六键配位反应, 因此配位数 $n=1$, 轴配反应为:



根据方程

$$\lg((A_c - A_o)/(A_\infty - A_c)) = n \lg c_{His} + \lg \beta \quad (2)$$

在一定波长下测 A 值. A_c 和 A_∞ , 以 $\lg((A_c - A_o)/(A_\infty - A_c))$ 对 $\lg c_{His}$ 线性回归, 由截距求 β 值. 实验中, 血红蛋白的浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 配体组氨酸的浓度为 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; 温度范围为 $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.2.4 配位反应的熵、焓 测定反应(1)在不同温度下的 β 值^[12,13], 配位系数与反应的熵、焓的关系式如下:

$$\Delta G_m^0 = -RT \ln K = \Delta H_m^0 - T \Delta S_m^0 \quad (3)$$

以 $\ln K$ 对 $1/T$ 线性回归, 求出标准摩尔焓 $\Delta_r H_m^0$ 、标准摩尔熵 $\Delta_r S_m^0$.

1.2.5 无硝色素的制备 将制备的血红蛋白液与组氨酸粗提液按体积比为 10:1 混和, 调 pH 值为 6.5, 室温下静置 30 min, 加入质量分数 0.5% 的异抗坏血酸钠、质量分数 1% 的山梨酸钾溶液, 混匀后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保藏. 液体色素可直接使用或通过糖基化处理^[14] 后喷雾干燥.

1.3 分析方法

1.3.1 蛋白质含量的测定 半微量凯氏定氮法和紫外分光光度法测 280 nm 吸收.

1.3.2 血红蛋白含量的测定 紫外分光光度法测 540 nm 吸收.

1.3.3 铁质量分数的测定 邻二氮菲法^[15].

2 结果与讨论

2.1 血红蛋白的纯化

通过生理盐水洗涤血细胞, 真空脱气后低温加热去除变性的杂蛋白等步骤, 逐步提高血红蛋白的纯度. 以 A_{540} 测血红蛋白、 A_{280} 测总蛋白的含量, 则 A_{540}/A_{280} 的值的不断变化可以表示每步操作的纯化效果, 结果见表 1.

A_{540}/A_{280} 比值的不断提高, 表明随着纯化处理的进行, 血红蛋白的纯度不断提高. 杂蛋白的存在将影响终产物的色泽, 并因蛋白变性产生沉淀, 降

低了色素产品的实用性. 因此, 在方便生产的前提下, 应尽可能地提高血红蛋白的纯度以制备出高品质的色素产品. 由表 1 可见, 60°C 加热去除杂蛋白后, A_{540}/A_{280} 的值已接近血红蛋白标准品的比值, 可用于无硝色素的制备.

表 1 不同纯化处理后样品 A_{280} 、 A_{540} 及其比值

Tab. 1 Absorption at 280, 540 nm and the ratio of samples under different treat methods

处理步骤	A_{540}	A_{280}	A_{540}/A_{280}
原血	0.227	1.060	0.214
离心后的血球	0.513	1.504	0.341
生理盐水洗涤	0.536	1.531	0.350
破壁后高速离心	0.610	1.577	0.386
60°C 加热除杂蛋白	0.565	1.410	0.401
标准血红蛋白	0.568	1.405	0.404

2.2 pH 值对血红蛋白-组氨酸配位复合物紫外吸收的影响

溶液的 pH 值是决定血红蛋白结构、性质及稳定性的重要因素, 同时也通过组氨酸配体的带电性质, 影响血红蛋白-组氨酸配位复合物的紫外吸收^[16]. 不同 pH 值下血红蛋白-组氨酸配位复合物的紫外吸收曲线见图 1. 选取配位复合物的特征吸收峰的波长 540 nm, 以 pH 值对吸光度作图, 结果见图 2.

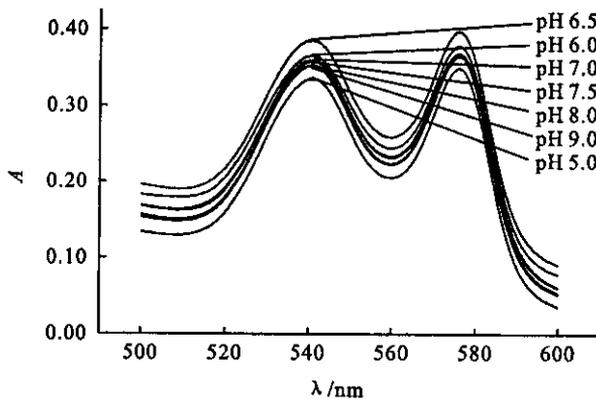


图 1 不同 pH 值条件下血红蛋白-组氨酸配位复合物的紫外吸收

Fig. 1 Absorption of Hb-His ligand complex at different pH

由图 1 和图 2 可见, 配位复合物的紫外吸收在 pH 值在 5 以下时最低, 此时组氨酸的咪唑基上的 N 原子被质子化, 与亚铁血红素的结合力最低, 同时珠蛋白上组氨酸残基与亚铁血红素发生部分解离, 使亚铁离子易于被氧化, 引起紫外吸收的大幅降低. 随着 pH 值的升高, 在 pH 为 6.5 时, 540 nm

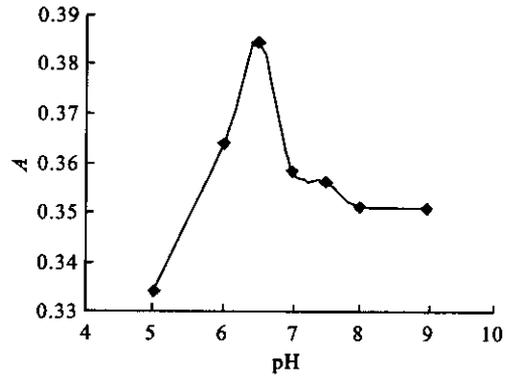


图 2 pH 对血红蛋白-组氨酸配位复合物在 540 nm 吸光度的影响

Fig. 2 Influences of pH on A_{540} of Hb-His ligand complex

处的特征吸收值最大, 是因为亚铁离子在配位化学的软硬酸碱理论中为中间酸, 易于与咪唑等中间碱类配位^[16], 组氨酸咪唑基上 N-H 的 pK_a 为 6.4, 而 pH 为 6.5 时最为接近不解离的状态, 即为中间碱, 其后随着 pH 的升高, 组氨酸咪唑基上 N-H 发生解离, 带负电性, 降低了配位复合物的稳定性, 吸光度下降.

2.3 配位复合物的稳定性——配位平衡常数 β

pH 6.5 时, 血红蛋白在不同配体组氨酸浓度下, 反应(1)达到平衡时体系的典型吸收光谱见图 3.

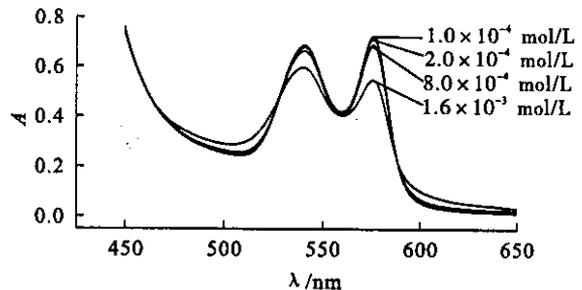


图 3 不同组氨酸浓度下配位复合物的紫外吸收

Fig. 3 Absorption of the complex under different concentration of His

随着组氨酸浓度的增加, 配位物的 Soret 带吸收升高, 但 Q 带却降低, 与 NO 、 CN^- 等与血红蛋白产生的配位复合物的紫外吸收变化相似^[5]. 在 465, 525, 585 nm 处出现等吸收点, 在配体浓度变化范围内, 等吸光点没有变化, 说明只有一种产物生成, 即血红蛋白-组氨酸配位复合物.

以 $\lg((A_c - A_o)/(A_{\infty} - A_c))$ 对 $\lg c_{\text{His}}$ 作图, 结果见图 4. 经拟和的直线方程: $y = 0.935 3x + 3.5641$

由直线的截距计算出配位平衡常数 $\beta = 3.66 \times 10^3$. 配位复合物的稳定性以配位平衡常数表示, 与配体的解离常数 pK_a 、配体的空间位阻、带电情况以及能否提供 π 电子有关. 对于相同类型的有机碱, 碱性(即 pK_a)大, 则 σ 配键能力强, β 值提高. 不

同类型的有机碱,咪唑类 β 值最大,其后是吡啶类、有机胺类。尽管吡啶类的碱性比脂肪胺类小很多,但配合物的 β 明显大于有机碱,这是因为咪唑和吡啶类配体不仅能形成 σ 配键,还具有 π 键合能力,会使 $Fe(II)$ 离开卟啉平面的距离变小,致使卟啉环 α_{2J} 轨道同 $Fe(II)$ 的 d_z^* 轨道相互作用降低,提高了配位稳定性^[17]。因此,解释了组氨酸是比烟酸、烟酰胺及有机胺等配体更好的亚硝酸钠的替代物。直线方程中的斜率为 0.9353,验证了组氨酸与血红蛋白的配位反应中配位数为 1。 $n < 1$, 可能是血红蛋白标准品未达到理论纯度引起的。

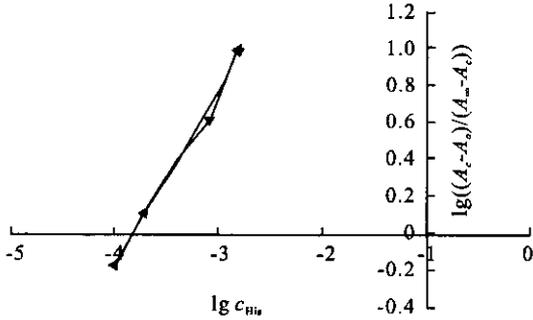


图 4 血红蛋白-组氨酸配位反应中 $lg((A_c - A_o)/(A_\infty - A_c))$ 与 $lg c_{mis}$ 关系

Fig. 4 Relation of $lg((A_c - A_o)/(A_\infty - A_c))$ and $lg c_{mis}$ for coordination reaction of Hb and His

2.4 血红蛋白与组氨酸配位反应的标准焓、标准熵在温度分别为 15, 20, 25, 30 °C 条件下测定反

表 2 不同温度下的配位平衡常数及配位反应的标准焓、标准熵

Tab. 2 The equilibrium constants, standard molecular enthalpy and entropy change at different temperature

L	n	$\beta/((mol^{-2} \cdot L^2) \times 10^{-3})$				$-\Delta_r H_m^0 / (kJ/mol)$	$-\Delta_r S_m^0 / (J/mol \cdot K)$	r
		15 °C	20 °C	25 °C	30 °C			
组氨酸	0.935 3	14.2	7.12	3.66	1.93	97.0	0.257	0.999 2

2.5 新型色素的组成

由提取的血红蛋白与组氨酸粗提液制备的红色素再通过与多糖反应,生成糖基化血红蛋白-组氨酸色素^[14],提高了产品的热、光照稳定性。喷雾干燥后,产品组成为铁质量分数 2.36 g/kg、糖类质量分数 15%、蛋白质质量分数 81.5% 的新型色素。灌肠实验表明,制备的无硝色素可以赋予肉制品理想的红色,且色泽稳定,再与防腐剂、抗氧化剂等组成多元腌制系统,可以完全替代亚硝酸盐在肉制品加工中的多功能性,实现无硝生产。

3 结 论

1) 通过生理盐水洗涤红血球、60 °C 加热后离心去除变性的杂蛋白等操作,提取的血红蛋白可用万方数据

应的 β , 以 $\ln\beta$ 对 $1/T$ 作图, 见图 5。

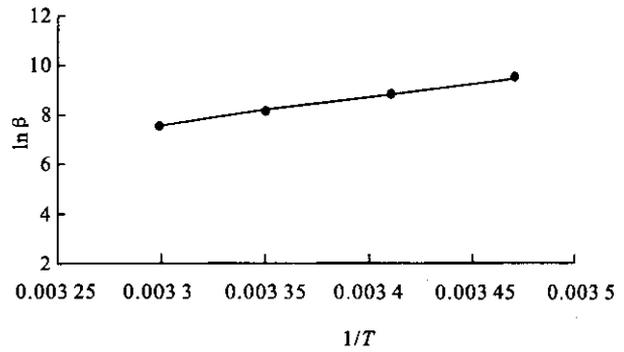


图 5 血红蛋白与组氨酸配位反应的 $\ln\beta$ 与 $1/T$ 关系

Fig. 5 Relation of $\ln\beta$ and $1/T$ for coordination reaction of Hb and His

拟和的直线方程为 $y = 11688x - 30.988$, 则由斜率和截距分别求出 $\Delta_r H_m^0$ 、 $\Delta_r S_m^0$, 结果见表 2。

由图 5、表 2 可见,组氨酸与血红蛋白的配位反应是熵降低焓也降低的过程,表明组氨酸与亚铁离子的第六键发生配位反应,生成稳定的配位复合物。研究表明,组氨酸与血红蛋白配位反应熵、焓的变化小于一氧化氮的,但大于氧、吡啶、有机胺等的与血红蛋白的配位反应^[5]。以配位理论的解释^[16]是,反应物血红蛋白中的血红素是 C_{4v} 对称性,而产物血红蛋白-组氨酸为 D_{4h} 对称性,反应后由高能级跃迁到低能级,体系放热,所以 $\Delta_r H_m^0 < 0$ 。再者,反应是两个物种生成一个物种,且对称性提高,混乱度降低,因此 $\Delta_r S_m^0 < 0$ 。

于制备新型色素。

2) 体系 pH 值对血红蛋白-组氨酸配位复合物的紫外吸收有明显的影 响,在 pH = 6.5 时,配位反应最易进行。

3) 配位平衡常数为 3.66×10^3 , 低于一氧化氮与血红蛋白的配位反应,但明显高于吡啶类、有机胺类的配体,表明组氨酸是亚硝酸钠的理想替代。配位数 $n < 1$, 表明血红蛋白标准品中不是存在单一的还原态血红蛋白,未达到理论纯度。

4) 配位反应的标准焓 $\Delta_r H_m^0 = -97.0$, 标准熵 $\Delta_r S_m^0 = -0.257$, 皆小于 0, 表明是熵、焓降低的过程。

参考文献:

- [1] Shahidi F, Pegg R B. Novel synthesis of cooked cured-meat pigment[J]. **Journal of Food Science**, 1991, 56(3): 1205—1212.
- [2] 丁之恩. 亚硝酸盐和亚硝胺在食品中的作用及其机理[J]. **安徽农业大学学报**, 1994, 21(2): 199—205.
- [3] 马美湖, 唐进明, 陈长龙, 等. 亚硝基血红蛋白(HbNO)的合成制取及其应用于香肠中降低 NO₂-残留量的研究[J]. **食品科学**, 2001, 22(7): 67—70.
- [4] Fuhrhop J H, Smith K M. Porphyrins and Metalloporphyrins[M]. New York: Elsevier Scientific Publishing Co., 1975.
- [5] 剑涛, 周思畅. 血红蛋白与一氧化氮的生物化学反应[J]. **生命的化学**, 2003, 23(5): 377—378.
- [6] 师同顺, 赵东源, 曹锡章. 二甲胺基尾式卟啉铁与双原子小分子 CO, NO 配位性质的研究[J]. **化学学报**, 1990, 48(10): 459—465.
- [7] 王远明. 无硝血红蛋白着色剂的研制[J]. **华东理工大学学报**, 1998, 24(6): 655—658.
- [8] 杨胜利, 张威. 咪唑—血红蛋白显色体系的研究及应用[J]. **长安大学学报(自然科学版)**, 2002, 22(5): 103—105.
- [9] 叶林奇. 组氨酸在蛋白质结构功能中的作用[J]. **涪陵师专学报**, 2000, 16(4): 74—76.
- [10] 倪春林, 姚中荣, 许登清. 单取代色氨酸卟啉铁(Ⅲ)与咪唑轴向配位反应热力学研究[J]. **黄淮学刊**, 1995, 11(3): 67—69.
- [11] 陈晓元, 张啸, 孟庆金. N—甲基咪唑与氯高铁血红素取代反应动力学[J]. **无机化学学报**, 1995, 11(2): 192—197.
- [12] 陈红卫, 朱志昂. 氯间取代四苯基卟啉铁与咪唑类配体配位反应的热力学研究[J]. **高等学校化学学报**, 1996, 10(4): 1608—1612.
- [13] 朱志昂, 阮文娟, 江冬青, 等. 铁(Ⅲ)卟啉轴向配位反应热力学研究[J]. **高等学校化学学报**, 1993, 14(8): 1055—1057.
- [14] 黄宇彬, 武冈真司, 土田英俊. 多糖蛋白质聚合物的合成[J]. **应用化学**, 1999, 16(3): 109—111.
- [15] 宁正详. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [16] 杨频, 高飞. 生物无机化学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [17] 杨频. 化学键理论在配合物中的应用[M]. 太原: 山西高校联合出版社, 1992.
- [18] 游效曾. 配位化学进展[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.

(责任编辑: 朱明)

(上接第 101 页)

- [3] Krinsky N I. Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention[J]. **Proc Soc Exp Biol Med**, 1998, 218: 95—97.
- [4] Mohitpal Singh, R Krishanappa. Efficacy of oral lycopene in the treatment of oral leukoplakia[J]. **Oral Oncology**, 2004, 40: 591—596.
- [5] Humberto R Matos. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2001, 396: 171—177.
- [6] Van Den Berg. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects[J]. **J Sci Food Agric**, 2000, 80: 880—912.
- [7] Albrecht M. Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids *b*-carotene and zeaxanthin[J]. **Biotechnol Lett**, 1999, 21: 791—795.
- [8] 陆斌. 药物新型剂与技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [9] 谢伯泰, 杨国武, 谢薇梅. 羟丙基- β -环糊精特性及其在医药领域中的应用与安全性[J]. **国外医药合成药、生化药、制剂分册**, 2002, 23(5): 302—306.
- [10] Andrea Mele, Raniero Mendichi, Antonio Selva. Non-covalent association of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with trans- β -carotene in water: evidence for the formation of large aggregates by light scattering and NMR spectroscopy [J]. **Carbohydrate Res**, 1998, 310: 261—267.
- [11] Andrea Mele, Raniero Mendichi, Antonio Selva, *et al.* Non-covalent association of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) with carotenoids in water. A study on the α - and β -cyclodextrin/ ψ , ψ -carotene (lycopen) system by light scattering ionspray ionization and tandem mass spectrometry[J]. **Carbohydrate Res**, 2002, 337: 1129—1136.
- [12] 张连富. 番茄红素开发及生理功能研究[D]: 无锡: 无锡轻工大学, 2000.
- [13] Rosenberg M. Microencapsulating properties of whey protein; Microencapsulating of anhydrous milk fat[J]. **J of Dairy Sci**, 1993, 76(10): 2868—2885.
- [14] Böhm V. Intestinal Absorption of Lycopene from Different Types of Oleoresin Capsules[J]. **J Food Sci**, 2002, 67: 1910—1913.

(责任编辑: 朱明)