

胞外高铁肌红蛋白还原酶电子传递活性位点的研究

王 玮, 金邦荃, 陆 艳, 刘瑾玲

(南京师范大学食品科学与营养系, 江苏 南京 210097)

[摘要] 以 NADH 为反应体系的启动剂, 研究猪心肌提取液中高铁肌红蛋白还原酶(M eM base)活性的表达, 实验结果证实酶活性的表达依赖 NADH 启动, 且 0.2mM NADH 浓度可充分启动 M eM base活性的表达. 研究还表明, ATP 可全程抑制 M eM base呼吸链电子的传递, 抑制酶的活性; NaN_3 通过阻断呼吸链第三位点电子传递来抑制酶活性的表达; 而 N-Ethylmaleimide 能与 M eM base 官能团巯基($-\text{SH}$)瞬间结合并快速使酶活性丧失; 二价金属离子能干扰活性的表达, Zn^{2+} 可促进 M eM base活性的表达; 而 Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 均抑制酶活性的表达, 且 Mg^{2+} 抑制强度大于 Cu^{2+} . 金属螯合剂 EDTA 可掩蔽自由金属离子对 M eM base 酶促反应的干扰, 改善酶活性的表达.

[关键词] 高铁肌红蛋白还原酶, 电子传递, NADH, NaN_3 , N-Ethylmaleimide, 二价金属离子

[中图分类号] O629.8 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)04-0059-06

Study on the Active Site of M eM base Electron Transport out of Cell

Wang Wei, Jin Bangquan, Lu Yan, Liu Jinlin

(Department of Food Science and Nutrition, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract M eM base extraction from porcine cardiac muscle was studied on its enzyme biochemical properties. For studying M eM base active site, NADH, ATP, NaN_3 , N-Ethylmaleimide and divalent metal ions were used as blockers or agonists in this research. The results showed that the expression of M eM base activity depended on NADH starting. The most optimum NADH concentration was 0.2mM so that NADH was a promotor for M eM base. In the reaction system, M eM base activity was inhibited by the higher ATP level because ATP could block electron transport in respiratory chain. At the third site M eM base activity was blocked by NaN_3 . M eM base was inactive through N-Ethylmaleimide bonding the sulfhydryl group($-\text{SH}$) in enzyme protein structure at the moment. In addition, M eM base activity was interfered by some divalent metal ions, such as Zn^{2+} , Cu^{2+} and Mg^{2+} . M eM base activity was increased by Zn^{2+} , while it was decreased by Cu^{2+} and Mg^{2+} . The inhibition of Mg^{2+} was more than that of Cu^{2+} . The free metal ions could be blocked by EDTA as a metal chelator. When EDTA was added in reaction system, M eM base activity was expressed enough.

Key words M eM base, electron transport, NADH, NaN_3 , N-Ethylmaleimide, divalent metal ions

高铁肌红蛋白还原酶系统(M eM base system)概念的提出, 源于临床医学上的一个推断. 研究者发现, 人体红细胞中的血红蛋白(Hb)在生理条件下易自动氧化生成高铁血红蛋白(MeHb), 而三价 $\text{Hb}(\text{Fe}^{3+})$ 在体内含量很低. 由此, 可以断定活体内存在一种能将 MeHb 还原的体系. 随后研究表明, 肌红蛋白(Mb)与细胞中的线粒体内电子传递体系密切关联, 且在低氧环境下比 Hb 更易于氧化. 然而, 体内高铁肌红蛋白(MeMb)含量却并不是很高, 故动物体内一定也存在一个类似于 Hb 的还原体系, 能还原 MeMb. 自 1960 年起, 一些学者在牛肉保鲜的研究中注意到, 牛肉中存在天然的还原系统^[1]. 现在普遍认为, M eM-base 主要在线粒体中, 且在微粒体中也低水平存在^[2]; M eM base 作为 M eMb 的酶促还原反应中关键酶, 以 NADH 作为辅酶并参与电子传递, 有效地将 $\text{MeMb}(\text{Fe}^{3+})$ 还原成二价 $\text{Mb}(\text{Fe}^{2+})$ 状态, 维系肉品色泽的

收稿日期: 2009-03-12

基金项目: 国家“863”科技攻关项目(2002AA242031-5)、江苏省六大人才高峰项目(184080H10202)、南京师范大学研究生优秀学位论文培育计划项目(181200000226)资助项目.

通讯联系人: 金邦荃, 博士, 教授, 研究方向: 食品肉品学. E-mail: jinbangquan@njnu.edu.cn

稳定性^[3]. 但对于 MeMb 是否能直接被电子传递链所还原还存有争议, 本实验拟通过特异性阻断剂, 研究 MeMbase 在电子传递链中的阻断位点, 试图解释 MeMb 的酶促还原反应与 NADH 呼吸链之间的关系, 并探讨诱导 MbO₂ 自动氧化的外在因素.

1 材料与方法

1.1 标准品及制备

95% 马心肌肌红蛋白 (Mb Sigma 公司); 93% 猪心肌高铁肌红蛋白 (MeMb 本实验室自制)^[4].

1.2 MeMbase 液制备

5 g 肉样 + 2.0mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 上清液.

1.3 标准液与工作液

将马和猪 MeMb 配制成 0.75 mM 浓度的标准液, 并以马 MeMb 标准液为参照系; 工作液分别由 5.0 mM EDTA、3.0mM K₄Fe(CN)₆、2.0mM NADH、50mM pH7.0 磷酸盐缓冲液等组成.

1.4 仪器与化学试剂

主要仪器: Spectrum lab54 紫外可见分光光度计 (上海)、FJ-200 高速分散匀质机 (上海)、PHS-3C 型精密 pH 计 (上海)、超级恒温水浴锅 (上海).

化学试剂: EDTA (Amresco)、NADH (98%, Amresco)、ATP (98%, Amresco)、N-Ethymaleimide (98%, 东京化成工业)、NaN₃、CuSO₄、MgSO₄、ZnSO₄、NaH₂PO₄、NaH₂PO₄、K₃Fe(CN)₆、K₄Fe(CN)₆·3H₂O (全为 AR 级).

2 实验方法

2.1 MeMbase 活性鉴定

取适量 MeMbase 提取液加入 EDTA 和磷酸盐缓冲液, 于波长 λ= 580 nm 处, 测定 MeMb 与 MbO₂ 的吸光度, 摩尔消光系数 (ε= 12×10³ mol⁻¹·m⁻¹·L)^[5,6].

MeMbase 活性单位: 1 U = 1 mol·m⁻¹·g⁻¹ (MeMb 与 MbO₂ 吸光度之差: ΔA = εCL).

2.2 阻断剂和激动剂的干扰特征

采用单因子实验设计, 进行 MeMbase 酶学特性的研究 (表 1).

2.3 数据处理与统计分析

原始数据采集并以组为单位计算平均数 ± 标准差 (x ± SD); 在实验中, 采用 SPSS13.0 软件进行统计处理 (序列号: IS-BN7-980009-06-1), 即单因子方差分析 (ANOVA); 当组间差异显著时进行 DUN-CAN 多重比较并检验显著性.

表 1 单因子实验设计
Table 1 Design of a single factor

阻断剂和激动剂	梯度设计							
NADH 浓度 /mM	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	
EDTA 浓度 /μM	0	1.0	10	50	100			
Zn ²⁺ 浓度 /μM	0	0.1	1.0	10.0				
Cu ²⁺ 浓度 /μM	0	0.1	1.0	10.0				
Mg ²⁺ 浓度 /μM	0	0.1	1.0	10.0				
NaN ₃ 浓度 /mM	0	0.1	1.0	10.0				
N-乙基顺丁烯二酰亚胺 浓度 /mM	0	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²				
ATP 浓度 /mM	0	1.0	5.0					

注: 重复样本 (平行样) n = 3

3 结果与分析

3.1 NADH 对 MeMbase 表达位点的影响

在可见光区域内, 对反应体系从 450 nm 到 700 nm 进行全程扫描. 当体系中无 NADH 时, 分别在 505 nm 与 630 nm 波长处可见 2 个吸收峰 (图 1, 标 A), 提示该 2 光谱吸收峰为 MeMb 特征峰; 当体系中加入 NADH 后, 随反应时间的延长, 505 nm 与 630 nm 处 MeMb 吸收峰逐渐衰减, 而 540 nm 与 580 nm 处分别形成 MbO₂ 吸收峰 (图 1, 标 B), 提示猪心肌 MeMbase 依赖 NADH 启动的酶促还原反应开始进行. 因此, MeMbase 酶促反应需在 NADH 的介导下发生反应并表现出吸收光谱的明显改变 (图 1).

在同一反应体系中, 以马和猪心肌 MeMb 为底物, 研究 NADH 对 MeMbase 活性表达的影响. 结果发现, 在无 NADH 的反应体系中, MeMbase 均不与马和猪心肌的 MeMb 发生响应; 当加入 0.1 mM NADH 时, MeMbase 活性得以启动; 表明 NADH 在 MeMbase 活性表达的初始阶段介导呼吸链的电子传递. 当

NADH 浓度逐渐升高时, 在 0.2 mM NADH 浓度条件下 M eM base活性达到拐点 (最高值); 之后 M eM base 活性呈饱和曲线趋势, 并未随着 NADH 浓度进一步升高而增加, 该酶反应曲线遵循 M ichealis-M enten的酶促动力学特征. 比较马和猪心肌 M eM b对猪 M eM base的响应曲线, 结果表明以猪心肌 M eM b为底物的猪 M eM base的响应曲线明显高于对马心肌 M eM b的响应, 证明 M eM base存在显著的物种差异 (图 2).

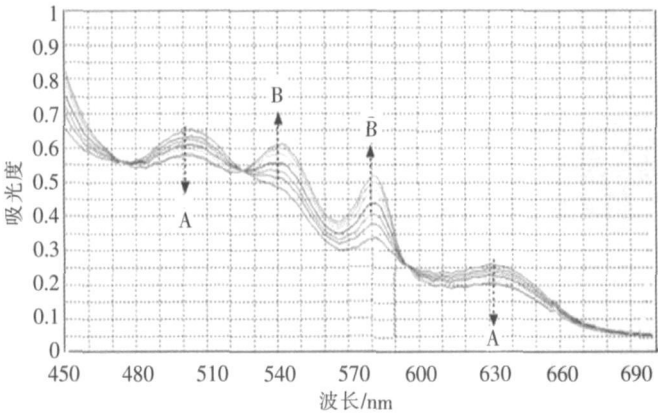


图 1 NADH 影响 MetMbase 的光谱图

Fig.1 Effect of NADH on spectral curve of MetMbase

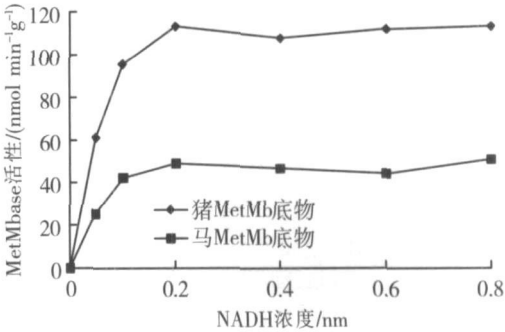


图 2 NADH 浓度对 MetMbase 活性表达的影响

Fig.2 Effect of NADH concentration on MetMbase activity

3. 2 抑制剂或阻断剂对 M eM base活性的作用

ATP是生化反应中重要的能量提供者, 当其在反应体系中过量时, 可能会抑制呼吸链电子的全程传递. 本实验探讨 0~ 5. 0mM ATP对 M eM base活性表达的干扰特点. 由表 2可知, 1. 0mM ATP即对 M eM base活性产生微弱的抑制; 当加入 5. 0mM ATP于反应体系中, 其酶活性降低 7. 17 nmol• m in⁻¹ • g⁻¹, 比活性降低 9. 73个百分点.

多数研究认为叠氮钠 (NaN₃) 可以阻断呼吸链中的电子传递. 本研究设计 4 个浓度梯度, 以观察 NaN₃对 M eM base反应过程中阻断形式. 结果表明, 仅 0. 1 mM NaN₃即可明显抑制 M eM base的活性, 使之下降 23. 36个百分点; 1. 0mM NaN₃使酶活性下降近 55%; 而 10. 0mM NaN₃使酶活性完全丧失. 有人认为 NaN₃是抑制了呼吸链中第三位点的电子传递^[7] (表 2).

N-乙基顺丁烯二酰亚胺 (N-E thymaleim ide) 是巯基化剂, 当反应体系中加入该物质后, 其可与 M eM -base的巯基 (- SH) 发生化学反应, 掩蔽了酶的活性. 本实验观察到, 仅加入 10⁻⁴ mM 的 N-E thymaleim ide, 即可完全掩蔽 M eM base的活性. 提示 M eM base的 - SH是重要的活性基团, 一旦被掩蔽, 酶的生物学功能丧失 (表 2).

3. 3 金属离子对 M eM base活性的影响

本实验选择 Zn²⁺、Cu²⁺ 和 Mg²⁺, 研究该 3 个二价金属离子对 M eM base活性的干扰特征. 结果观察到, 在 0~ 10. 0μM 浓度范围内, 金属离子浓度与 M eM base的相对活性呈直线相关; 线性方程分别为: Y_[Zn²⁺] = 6. 99x + 92. 745; Y_[Cu²⁺] = - 5. 527x + 105. 2 Y_[Mg²⁺] = - 7. 647x + 108. 64 其中 [Zn²⁺] 与酶活性表达呈显著性正相关 (R² = 0. 963 2 p < 0. 01), 而 [Cu²⁺] 和 [Mg²⁺] 则与酶活性表达呈显著性负相关 (R² = - 0. 942 8 R² = - 0. 956 3 p < 0. 01); 同时注意到, 当离子浓度从 0. 1 μM 上升到 1. 0 μM 时, 体系中 [Zn²⁺] 可显著提高酶活性的表达 (p < 0. 05); 当离子浓度从 1. 0 μM 上升到 10. 0 μM 时, 体系中 [Mg²⁺] 可

表 2 抑制剂或阻断剂的作用

Table 2 Action of inhibitors or blockers

抑制剂	浓度 /mM	酶活性 / (nmol m in ⁻¹ • g ⁻¹)	相对活性 %
None	0	73. 68	100
ATP	1. 0	72. 42	98. 28
	5. 0	66. 51	90. 27
	0. 1	56. 54	76. 74
	1. 0	33. 25	45. 13
NaN ₃	10. 0	0	0
	10 ⁻⁴	0	0
	10 ⁻³	0	0
	10 ⁻²	0	0

注: 重复样本 (平行样) n = 3

表 3 [Zn²⁺], [Cu²⁺], [Mg²⁺] 对 M eM base活性的干扰

Table 3 Influence of [Zn²⁺], [Cu²⁺] and [Mg²⁺] on M eM base activity

浓度 /μM	相对活性 % (均数 ±标准差)		
	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Mg ²⁺
0	100. 0 ± 0 ^a	100. 0 ± 0 ^b	100. 0 ± 0 ^c
0. 1	105. 14 ± 1. 29 ^a	92. 48 ± 6. 11 ^b	93. 36 ± 2. 60 ^b
1. 0	116. 09 ± 7. 02 ^b	90. 94 ± 7. 11 ^{ab}	88. 74 ± 0. 31 ^b
10. 0	119. 65 ± 1. 65 ^b	82. 09 ± 5. 09 ^a	76. 09 ± 5. 93 ^a

注: 组间肩表字母相同时, 表示无显著性差异; 当组间肩表字母不同时, 如 a b或 c, 表示组间差异 p < 0. 05 相关性分析 (R²), 水平达到极显著时 p < 0. 01

显著抑制酶活性的表达 ($p < 0.05$); 而 $[Cu^{2+}]$ 的增加可以逐步抑制酶的活性, $10.0 \mu M$ 浓度的抑制程度显著大于 $0.1 \mu M$ ($p < 0.05$ 表 3, 图 3).

3.4 EDTA 对 MeMbase活性的影响

EDTA 通过螯合作用, 可抑制金属离子诱导的蛋白酶自动氧化过程. 本实验以 MeMbase为对象, 研究缓冲体系中 EDTA 对二价金属离子的屏蔽作用. 当 EDTA 浓度从 0 升至 $0.1 \mu M$ 时, 即可有效屏蔽金属离子对 MeMbase活性的干扰; 之后随着浓度升高, 其反应曲线呈饱和状态 (图 4).

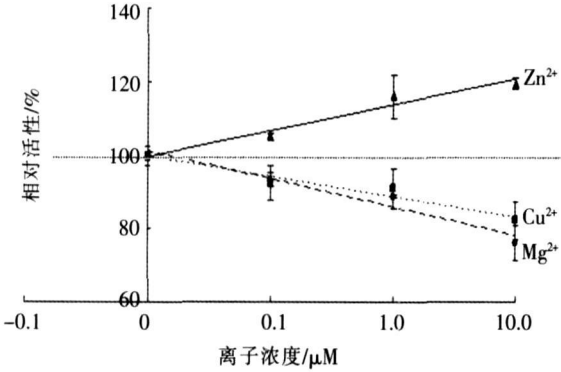


图 3 金属离子对 MetMbase 活性的影响

Fig.3 Effect of ions on MetMbase activity

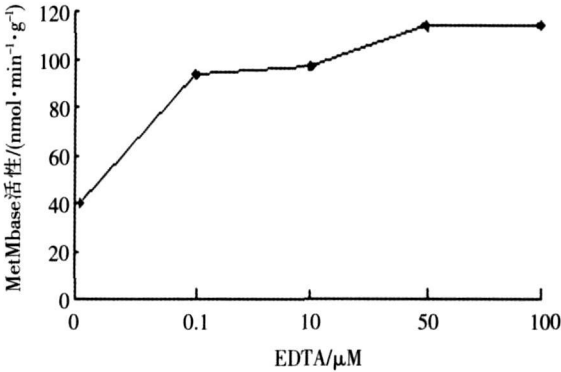


图 4 EDTA 对 MetMbase 活性的影响

Fig.4 Effect of EDTA on MetMbase activity

4 讨论与结论

MeMb-MbO₂-DMb是肉色稳定表达的基本体系, 肌红蛋白 (Mb) 又分为氧合肌红蛋白 (MbO₂, Fe²⁺), 非氧合肌红蛋白 (DMb, Fe²⁺) 和高铁肌红蛋白 (MeMb, Fe³⁺), 其肉色表达分别呈现为鲜红色、暗褐色和棕红色. 肌红蛋白功能团为铁卟啉环, 其中 Fe³⁺ 捕获电子转化为 Fe²⁺, 而 Fe²⁺ 失去电子转化为 Fe³⁺. 这一氧化还原过程受到 MeMbase的调节, 使三者处于动态平衡以表达理想的肉色.

宰后肌肉中 MeMbase活性逐渐丧失, 其中 0~3 d 内呈快速失活态势; 随着 MeMbase 缺失, 肌肉中 MeMb 转换成 Mb 比例逐渐减少, 而肉色也逐渐褐变^[8]. 为了充分利用肌肉本身保鲜护色的酶反应体系, 本实验旨在研究影响宰后肌肉中 MeMbase表达的干扰因素及阻断部位, 以期进一步认识 MeMbase的生物学特性, 为生鲜肉保鲜技术的发展提供实验依据.

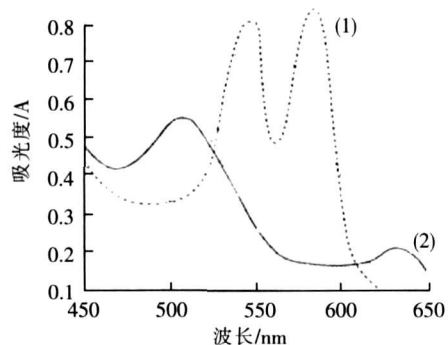
4.1 NADH对 MeMbase酶学特性的影响

研究者认为, NADH 是骨骼肌胞内 MeMbase活性表达的最重要限制因素之一. NADH 作为辅酶介导细胞色素呼吸链电子传递过程, 帮助 MeMb(Fe³⁺) 得到电子转变成 Mb(Fe²⁺), 以维系正常肉色. NADH 是 MeMbase酶促反应中必不可少的重要成份, 随着反应体系中 NADH 浓度升高, MeMbase活性逐渐增强. 有人观察到, 绵羊背最长肌 MeMbase对 NADH 适宜响应浓度为 0.05 mM , 之后随着 NADH 浓度升高, 酶活性表达成饱和趋势^[3,9,10].

本实验分别以马心肌 MeMb(标准品) 和猪心肌 MeMb为底物, 观察猪心肌 MeMbase在不同 NADH 浓度条件下的酶活性变化. 结果发现无 NADH 时, 反应体系中 MeMbase无活性的表达; 而加入 0.1 mM NADH 时, 其酶促反应立即启动, 表明 NADH 是 MeMbase启动位点的激动剂. 光谱扫描表示, 当 MeMb和 MeMbase反应时, 位于 505 nm 和 630 nm 处的特征峰发生光谱偏移, 分别移至 540 nm 和 580 nm 处出现最大吸收峰值 (图 1). 比对 MbO₂ 光谱特征峰 (图 5)^[11], 本实验得到 MeMb响应曲线与前人基本一致; 推测 540 nm 和 580 nm 处的吸收峰值可能是 MeMb和 MeMbase结合后的光谱表达, 初步证明本实验获得的猪心肌提取物是 MeMbase 实验还发现当以猪心肌 MeMb为底物时, 酶活性的表达是 NADH 依赖型的, 与 Mikkelsen 等人报导相似; 推测 MeMbase依靠 NADH 呼吸链来维系 MeMb与 Mb之间的动态转换 (图 6). 猪心肌 MeMbase与 MeMb反应的 NADH 适宜浓度为 0.2 mM , 接近他人在猪骨骼肌中研究结果 ($0.1 \sim 0.15 \text{ mM}$).

4.2 抑制剂或阻断剂对 MeMbase活性的影响

抑制剂或阻断剂与酶结合后, 引起酶的活性中心或必需基团的化学性质发生改变, 从而使酶活性降低



(1) 氧合肌红蛋白(MbO₂);(2) 高铁肌红蛋白(MetMb)

图 5 肌红蛋白的吸收光谱

Fig.5 Absorption spectra of Myoglobin

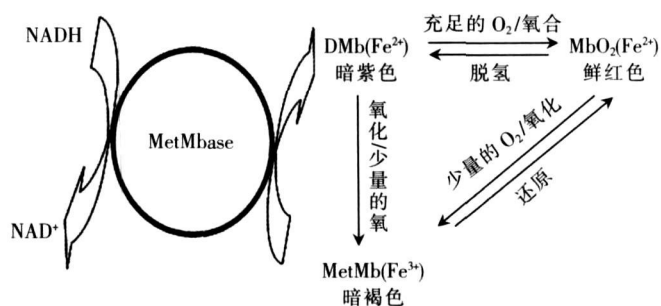


图 6 MetMb 酶促反应途径

Fig.6 The pathway of Metmyoglobin reduction

或丧失. 研究者们发现, 酶反应体系中因电子传递伴随着 ADP 磷酸化为 ATP 过程, 当 $[ATP]/[ADP]$ 比值过高时, 电子传递速度逐渐减缓, 乃至整个呼吸链受到抑制或阻断, 从而影响酶活性的表达. 牛心肌 MeMbase 活性表达可被抗霉素 A 和鱼藤酮阻断, NaN_3 是抗霉素 A 和鱼藤酮的类似物, 可切断细胞色素 a_{a_3} 至 O_2 呼吸链上的电子流, 故可有效阻断电子转移, 抑制部位是第三位点. 其他学者在研究猪肝微粒体中 NADH-细胞色素 b_5 还原酶活性的表达时, 注意到巯基烷化剂 - 对氯汞苯甲酸 (PCMB), 烷化细胞色素 b_5 酶的官能团 - 巯基, 使该酶构相发生改变, 从而强烈抑制细胞色素 b_5 酶活性的表达^[12-14].

本实验采用上述类似物 (ATP, NaN_3 , N-Ethylmaleimide) 作为抑制剂或阻断剂, 研究 MeMbase 在反应体系中的关键位点. 研究发现, 通过加入外源性 ATP 来观察其对 MeMbase 反应体系的影响. 注意到反应体系中加入 0~0.5 mM ATP, 可即时升高 $[ATP]/[ADP]$ 比值, 从而明显延缓电子传递速度, 而抑制了 MetMbase 活性的表达, 提示 ATP 是 MeMbase 酶促反应体系中全程抑制剂.

本实验采用 NaN_3 作为 MeMbase 酶促反应关键位点的阻断剂, 实验中 NaN_3 可显著抑制酶活性的表达, 每提高一个数量级 NaN_3 浓度, 即可使 MeMbase 活性大幅降低. 1.0 mM NaN_3 使 MeMbase 活性丧失约 53%, 10.0 mM NaN_3 使 MeMbase 活性完全丧失, 证实 NaN_3 在呼吸链电子传递中阻断了 MeMbase 反应. NaN_3 与氰化物的作用相似, 与肌红蛋白的血红素 $a_3 (Fe^{3+})$ 作用, 可特异性阻断呼吸链上第三位点的电子传递.

N-Ethylmaleimide 作为巯基烷化剂可以与巯基 ($-SH$) 发生反应, 使酶活性中心的 $-SH$ 基烷化, 酶蛋白变构导致了酶的失活. 本研究采用 N-Ethylmaleimide 对 MeMbase 活性进行抑制, 发现该酶官能团能与它瞬间结合并快速丧失活性, 首次由本实验结果推测肌肉 MeMbase 活性中心是含有 $-SH$ 基的官能团. N-Ethylmaleimide 可靶向定位改变 MeMbase 蛋白结构, 导致精确位点阻断.

4.3 金属离子对 MeMbase 酶学特征的影响

金属离子是稳定酶三维结构的重要因素, 也可以作为辅酶或辅基直接参与酶促反应. 早期研究发现, Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 激活金枪鱼 MeMbase 的活性, 而 Li^+ 、 Mg^{2+} 和 Co^{2+} 却抑制该酶活性的表达; 仅发现 Fe^{2+} 激活牛心肌 MeMbase, 而 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 则抑制心肌中该酶活性的表达^[15, 16].

本实验通过在反应体系中加入不同浓度的二价金属离子, 如 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} , 探讨它们对猪心肌 MeMbase 活性的影响. 研究发现, 反应体系中 0.1~10.0 μM 的离子浓度范围内, 3 个金属离子对 MeMbase 活性的影响各不相同. $[Zn^{2+}]$ 达到 1.0 μM 时, 反应体系中 MeMbase 活性显著高于 0.0 和 0.1 μM $[Zn^{2+}]$; 当离子浓度升高到 10.0 μM 时, 酶活性进一步显著升高. $[Cu^{2+}]$ 达到 10.0 μM 时, 反应体系中 MeMbase 活性显著低于 0.0 和 0.1 μM $[Cu^{2+}]$; 而体系中 $[Mg^{2+}]$ 达到 0.1 μM 浓度时即可显著抑制 MetMbase 活性, 抑制程度呈数量级增强 ($p < 0.05$). 且本实验发现, Mg^{2+} 抑制强度大于 Cu^{2+} ; 反言之, 即 Cu^{2+} 对 MeMbase 活性抑制相对较弱.

4.4 EDTA 对 MeMbase 酶学特性的影响

EDTA 是金属螯合剂, 本实验应用它以期降低自由金属离子对酶促反应的干扰. 对 MeMbase 酶学的应用研究中, 有人认为 EDTA 对酶活性表达无明显干扰; 而另有人认为 EDTA 可能会屏蔽反应体系中金属

离子对 M eM base活性的干扰,有利于 M eM base活性的表达^[9 15].

为此,本实验设计 5 个浓度梯度的 EDTA 反应体系,如表 1 所示,以研究猪心肌 M eM base活性的表达.研究发现,反应体系中无 EDTA 时 (0.0 μM),M eM base活性为 40U;当给予 0.1 μMEDTA, M eM base活性迅速上升至 94 U,其酶活性提高 100% 以上.结果提示,EDTA 可有效屏蔽反应体系中金属离子对 M eM-base活性的干扰,加快该酶的反应速度,改善酶活性的表达.

综上所述,猪心肌 M eM base活性的表达依赖于 NADH 启动, NADH 适宜浓度为 0.2 mM.反应体系中 ATP 浓度的升高,可能抑制了 M eM base活性表达过程中呼吸链的电子传递; NaN_3 在呼吸链上第三位点阻断电子传递;而 N-Ethymaleimide 烷化了 M eM base的-SH 基官能团,导致其酶活性的完全丧失.二价金属离子可以干扰 M eM base活性,其中 Zn^{2+} 促进酶活性的表达,是 M eM base的激动剂;而 Cu^{2+} 和 Mg^{2+} 抑制酶活性的表达,且 Mg^{2+} 抑制效果明显大于 Cu^{2+} ,二者均是 M eM base的抑制剂.在反应体系中加入适量 EDTA,可有效屏蔽金属离子对 M eM base活性的抑制.

[参考文献]

- [1] Dean R W, Ball C O. Analysis of themyoglobin fractions on the surface of beef cut[J]. Food Technolgy, 1960, 14: 271-285.
- [2] Arhara K, Cassens R G, et al. Localization of metmyoglobin-reducing enzyme (NADH-cytochrome b5 reductase) system components in bovine skeletal muscle[J]. Meat Science, 1995, 39: 205-213.
- [3] Mikkelsen A, Juncher D, Skibsted L H. Metmyoglobin reductase activity in ovine m. Longissimusdorsi muscle[J]. Meat Science, 1999, 51: 155-161.
- [4] 汤祥明,金邦荃,曹鹏,等.猪心肌中高铁肌红蛋白的提取和纯化[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(7): 34-36
- [5] Ledward D A. Colour of Raw and Cooked Meat: The Chemistry of Muscle-based Foods[M]. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1992: 33-68.
- [6] Bekhit A D, Geesink G H, Ilian M A, et al. Particulate metmyoglobin reducing activity and its relationship with meat colour[J]. J Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(20): 6026-6035.
- [7] Tang Jiali, Cameron Faustma J, Richard A, et al. Mitochondrial reduction of metmyoglobin: dependence on the electron transport chain[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(13): 5449-5455.
- [8] 王玮,汤祥明,金邦荃.高铁肌红蛋白、高铁肌红蛋白还原酶与冷鲜肉肉色稳定性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 94-97.
- [9] Echevame C, Renere M, Labas R. Metmyoglobin reductase activity in bovine muscles[J]. Meat Science, 1990, 27: 161-172.
- [10] 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.
- [11] Warriss P D. Meat Science: An Introductory Text[M]. New York: CABI Publishing, 2000.
- [12] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学[M].北京:高等教育出版社, 2002: 128-129, 140-141.
- [13] 俞秀玲,朱忠勇.猪肝微粒体 NADH-细胞色素 b5 还原酶的纯化及特性分析[J]. 生物化学与生物物理学报, 1994, 26(3): 297-302.
- [14] Watts B M, Kendrick J, Zipser M W, et al. Enzymatic reducing pathways in meat[J]. Journal of Food Science, 1966, 32: 855-862.
- [15] Pong C Y, Chiu T K, Nieh F P, et al. Purification and characterization of metmyoglobin reductase from ordinary muscle of blue-fin tuna[J]. Fisheries Science, 2000, 66(3): 599-604.
- [16] Hagler L, Coppes J. 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): 6505-6514.

[责任编辑:顾晓天]