

鸭血酶解产物亚铁螯合能力的研究及酶解物的组分分析

杨雁如^{1,2}, 刘 洋¹, 孙杨赢^{1,2,*}, 潘道东^{1,2}

(1. 宁波大学食品与药学学院, 浙江宁波 315800;

2. 浙江省动物蛋白食品精深加工技术重点实验室, 浙江宁波 315800)

摘 要: 为了提高鸭血的高值化利用, 本研究以鸭血为原料, 通过单因素实验以及响应面试验确定了制备具有高亚铁螯合能力的鸭血酶解产物的最优酶解工艺, 并分析了最优工艺下鸭血酶解产物的氨基酸组成和分子量分布情况。结果表明: 碱性蛋白酶酶解鸭血的最佳酶解工艺为: 酶添加量为 9800 U/g, 酶解温度 50 ℃, pH11, 酶解时间为 2 h, 此条件下亚铁螯合率为 65.36%。相对分子质量分布结果显示, 分子量在 1500 Da 以下的多肽组分约占 72.01%。氨基酸组成分析发现酶解产物的总氨基酸含量约为 76.25%, 其中 Lys、Glu、Asp、His 含量较高, 分别占氨基酸总量的 10.25%、13.95%、9.67%、8.89%。这些氨基酸对亚铁离子有较强的螯合作用。优化碱性蛋白酶水解鸭血制备具有高亚铁螯合能力的鸭血酶解产物的酶解工艺可靠、合理, 酶解产物具有较好的体外亚铁螯合活性。研究结果将为畜禽血液补铁剂的开发提供一定的理论依据。

关键词: 鸭血, 碱性蛋白酶, 亚铁螯合率, 分子量分布, 氨基酸组成

Study on Iron-chelating Ability of Duck Blood Hydrolysates and Components Analysis of the Hydrolysates

YANG Yan-ru^{1,2}, LIU Yang¹, SUN Yang-ying^{1,2,*}, PAN Dao-dong^{1,2}

(1. College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315800, China;

2. Key Laboratory of Animal Protein Food Deep Processing Technology of Zhejiang Province, Ningbo 315800, China)

Abstract: In this study, in order to improve the high value utilization of duck blood, duck blood was used as raw material, the technological conditions for producing enzymatic hydrolysate with high iron-chelating ability of duck blood and the components of hydrolysates were studied. Based on the result of single factor experiments, response surface methodology (RSM) was carried out with the determination of iron-chelating rate. The results showed that the optimum hydrolysis conditions of duck blood by alcalase were as follows: Enzyme addition 9800 U/g, hydrolysis temperature 50 ℃, pH11, hydrolysis time 2 h. The actual iron-chelating rate of the peptides prepared under the optimized condition was 65.36%. The relative molecular weight of enzymatic hydrolysate was mainly below 1500 Da and accounted for 72.01%. Amino acid composition analysis showed that the contents of total amino acid were about 76.25% in the enzymatic hydrolysate, among which Lys, Glu, Asp and His were higher, accounting for 10.25%, 13.95%, 9.67% and 8.89% of the total amino acids, respectively. And these amino acids had stronger iron-chelating activity. The optimized process for the preparation of enzymatic hydrolysate with high iron-chelating ability from duck blood was reliable and reasonable, and hydrolysates had better iron-chelating activity *in vitro*. The results would provide some theoretical basis for the development of iron supplement in animal blood.

Key words: duck blood; alcalase; iron-chelating rate; molecular weight distribution; amino acid composition

中图分类号: TS251.93

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)19-0179-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.028

引文格式: 杨雁如, 刘洋, 孙杨赢, 等. 鸭血酶解产物亚铁螯合能力的研究及酶解物的组分分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 179-185.

鸭血是肉鸭屠宰过程中产生的一种副产物, 含有 17%~21% 的蛋白质且富含微量元素和其它一些

生物活性物质^[1]。但是, 我国鸭血资源利用率不高, 其中大多数鸭血直接当做废弃物处理掉, 少数加工

收稿日期: 2020-01-15

作者简介: 杨雁如 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水禽产品加工及副产物综合利用, E-mail: ningdayangyanru@163.com。

* 通讯作者: 孙杨赢 (1986-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 水禽产品加工及副产物综合利用, E-mail: sunyangying@nbu.edu.cn。

基金项目: 国家水禽产业技术体系水禽加工与副产物综合利用 (CARS-42-25); 宁波市科技富民项目 (2017C10038)。

成鸭血制品供大家食用。目前市场上的鸭血制品主要是通过制备鸭血豆腐食用^[2]。关于鸭血的报道也主要集中在鸭血豆腐品质的研究,其中有关鸭血的高值化综合利用的研究鲜有报道。如孙月萍等^[3]研究发现魔芋胶和瓜尔豆胶协同作用可以显著提高鸭血豆腐的质构特性。王道营等^[4]研究发现鸭血经过超声波(400 W, 6 min)前处理,可以有效提高鸭血豆腐品质。鸭血是优质的蛋白质来源,通过酶法水解可以将难以消化利用的大分子蛋白质水解成小分子多肽,不但能够提供人类营养,而且具有调节人体生理机能的功效^[5]。

据报道,世界上近五分之一的人口由于缺铁而出现营养问题,其主要原因是人体摄入和吸收铁的量不足^[6]。铁能够以铁盐、金属螯合剂和铁螯合肽的形式提供。然而,铁盐和金属螯合剂由于其生物利用率低、对肠道有刺激作用等缺点而限制其利用^[7]。有研究证明铁螯合肽在提高生物利用率、吸收性和金属稳定性方面具有较大的优势,成为科学家们关注的热点^[8]。李玉珍等^[9]利用碱性蛋白酶酶解冷榨花生粕蛋白得到的花生多肽液,其多肽-亚铁螯合率为85.68%。胡乔迁等^[10]以芝麻蛋白为原料,利用响应面实验优化了碱性蛋白酶制备芝麻蛋白亚铁螯合物的工艺,优化后酶解产物的亚铁螯合率为72.36%。酶的选择在一定程度上会影响酶解最终产物的功能活性。碱性蛋白酶是一种内切蛋白酶,可以水解肽键、酯键、酰胺键^[11-12]。赵静^[13]探究了碱性蛋白酶等六种不同的蛋白酶对水解猪血红蛋白的影响,结果发现经过碱性蛋白酶酶解得到的多肽产物亚铁螯合率最高。但目前对鸭血蛋白螯合肽的研究还不够深入,利用蛋白酶水解技术将鸭血蛋白水解成小分子肽是提高利用鸭血蛋白的有效手段之一,同时说明碱性蛋白酶酶解鸭血前景广阔。

本实验以鸭血为原材料,利用碱性蛋白酶水解鸭血获得小分子肽,通过单因素实验及响应面优化试验,得到制备具有高亚铁螯合能力的鸭血酶解产物的最优工艺,同时分析酶解产物的氨基酸组成情况,以期促进鸭血的高值化利用,为酶法制备鸭血活性肽提供参考,同时为畜禽加工副产物的开发利用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸭血 宁波北仑食品有限责任公司提供;碱性蛋白酶(比活力 $>2 \times 10^5$ U/g)(食品级)、ferrozine(菲咯嗪)试剂 北京索莱宝科技有限公司;柠檬酸钠、氢氧化钠、氯化亚铁、硝酸钠、聚乙二醇等均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

PL403 电子精密天平 上海梅特勒-托利多仪器有限公司;恒温水浴锅 常州国华电器有限公司;Centrifuge 5804R 离心机 艾本德中国有限公司;Infinite 200 Pro 全波长扫描多功能酶标仪 瑞士 Tecan 公司;L-8900 氨基酸自动分析仪 日本日立公司;高效液相色谱仪 美国 Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鸭血前处理 以 10 g/L 的柠檬酸钠为抗凝剂,按照血液量:抗凝剂=100:1 添加抗凝剂,混匀^[14]。4℃下快速运回实验室,立即用 100 目筛过滤,去除不可溶性杂质。为保证样品的品质以及每次试验样品的均一性,将抗凝鸭血分装在 50 mL 离心管中,真空冷冻干燥,并将冻干后样品(鸭血粉)于-40℃冰箱保存。

1.2.2 鸭血酶解产物的制备 称取一定量的鸭血粉,用磷酸盐缓冲液(pH=8.0)溶解,配制成蛋白浓度为5%的鸭血溶液,用 1 mol/L 的氢氧化钠调节至目标 pH,然后加入一定量的碱性蛋白酶在一定温度下开始酶解。酶解结束后,将反应液置于 95℃沸水中灭酶 10 min,冷却后离心(5000 r/min, 20 min)取上清液,真空冷冻干燥后得到鸭血酶解产物。

1.2.3 单因素水平设计 通过查阅相关文献,本实验选取酶添加量、pH、酶解温度和时间这四个比较显著的因素进行考察^[13,15]。以亚铁螯合率为主要评价指标,水解度为辅助指标,依次探究酶添加量、pH、酶解温度和时间对亚铁螯合率和水解度的影响。当 pH 为 10.0,酶解温度为 50℃,酶解时间为 2 h,依次设定酶添加量为 4000、6000、8000、10000、12000 U/g 五个水平;当酶添加量为 10000 U/g,酶解温度为 50℃,酶解时间为 2 h,依次设定 pH 为 8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 五个水平;当酶添加量为 10000 U/g, pH 为 11.0,酶解时间为 2 h,依次设定酶解温度为 40、45、50、55、60℃五个水平;当酶添加量为 10000 U/g,酶解温度为 50℃,pH 为 11.0,依次设定酶解时间为 1.5、2、2.5、3、4 h 五个水平。

1.2.4 响应面试验设计 根据单因素实验结果和 Box-Behnken 实验设计原理,以亚铁螯合率为因变量,对酶添加量、酶解 pH、酶解温度和酶解时间这四个因素进行多因素方差分析,最后确定酶添加量、酶解温度和酶解时间这三个比较显著的因素作为自变量,进行三因素三水平优化实验,采用软件 Design-Expert V8.0.6.1 分别对其进行编码。表 1 为响应面试验因素与水平编码表。

表 1 响应面试验因素与水平编码表
Table 1 The code table of factors and their levels used in response surface experiment

水平	因素		
	X ₁ 酶添加量 (U/g)	X ₂ 酶解温度 (℃)	X ₃ 酶解时间 (h)
-1	8000	45	1.5
0	10000	50	2
1	12000	55	2.5

1.2.5 水解度(Degree of hydrolysis, DH)的测定 本文采用 pH-state 法测定,按照 1.2.2 制备酶解产物。称取一定量的鸭血粉(经 1.2.1 制备得到),用 pH=8 的磷酸盐缓冲液溶解,水解开始时用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节反应体系的 pH 至目标 pH,另外在反应过程中每隔 15 min 用 0.5 mol/L 的氢氧化钠调节

一次 pH,使反应体系 pH 维持在固定的 pH,最后通过加入碱的量来计算水解度。计算公式如下:

$$DH = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

式中:DH 为水解度,%;B 为消耗的氢氧化钠体积,mL; N_b 为氢氧化钠的浓度,mol/L; α 为平均氨基解离度, $\frac{1}{\alpha} = 1 + 10^{pK-pH}$,pH 为水解液酸碱度,pK 为水解时 α -氨基酸的平均解离常数,参见文献[16]; M_p 为底物中蛋白质的含量,g,蛋白含量的测定采用凯氏定氮法^[17]; h_{tot} 为蛋白质中肽键的质量摩尔浓度,mmol/g,本实验中 $h_{tot} = 8.3$ ^[18]。

1.2.6 亚铁螯合率测定方法 参考 Torres-fuentes 等^[19]方法稍加改动。将 100 μ g 鸭血酶解产物与 250 μ L 醋酸钠缓冲液 (pH5.0,100 mmol/L) 混合,加入 30 μ L 氯化亚铁 (0.01%,w/v),在 37 $^{\circ}$ C 下保温 30 min,加入 13 μ L ferrozine 试剂 (40 mmol/L)。用蒸馏水替代样品作总铁对照,用蒸馏水替代 ferrozine 试剂作空白对照。最后在 562 nm 处测定吸光度。

亚铁螯合率计算公式如下:

$$\text{亚铁螯合率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为总铁对照吸光度; A_1 为样品吸光度; A_2 为空白对照吸光度。

1.2.7 分子量的测定 分子量测定采用凝胶渗透色谱 (GPC) 方法^[20]。准确称取 0.30 g 经方法 1.2.4 优化后得到的鸭血酶解产物,溶于 5 mL 0.1 mol/L 的 NaNO_3 溶液中,超声分散后待测。流动相:0.1 mol/L NaNO_3 溶液,流速为 1 mL/min,紫外检测波长为 220 nm。标准品:不同分子量窄分布聚乙二醇,分子量 (M_p) 分别为 330000、176000、82500、44000、25300、20600、12600、7130、4290、1400、633、430。

1.2.8 氨基酸组成分析 参考 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》^[21]的方法。

1.3 数据分析

所得实验数据采用 IBM SPSS Statistics 24.0 软件进行单因素方差 (One-Way ANOVA) 的 Duncan's Multiple Range Test 进行多组样本间显著性差异分析,每个试验重复 3 次,差异显著水平设置为 $P < 0.05$ 。采用 Origin 8.0 软件制图。利用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面优化实验设计和实验数据的多元回归拟合分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 酶添加量对亚铁螯合率和水解度的影响 如图 1 所示,随着酶量的增加,亚铁螯合率和水解度都呈现先升高后下降的趋势。当酶添加量为 10000 U/g 时,水解度和亚铁螯合率都达到最大值,分别为 $23.23\% \pm 0.17\%$ 、 $52.32\% \pm 1.3\%$ 。增加酶的添加量有利于底物与酶充分接触,加快酶解反应速度,提高水解度。当加酶量超过 10000 U/g,水解度开始下降,是因为当酶与底物作用达到最大承载能力,再增加酶量反而会抑制酶解反应^[22]。亚铁螯合率下降的

原因是过量的酶分子会阻碍中间产物向酶解终产物的转化,从而导致酶解物的亚铁螯合率的降低^[23]。所以综上考虑,选取 10000 U/g 为最佳酶添加量。

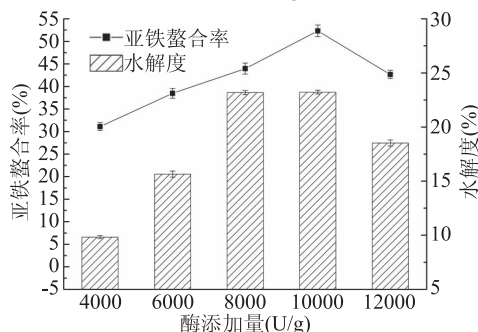


图1 酶添加量对亚铁螯合率和水解度的影响

Fig.1 Effect of enzyme dosage on iron-chelating rate and DH

2.1.2 pH 对亚铁螯合率和水解度的影响 pH 对亚铁螯合率和水解度的影响如图 2 所示。pH 从 8 升到 11,亚铁螯合率随着 pH 的升高而升高,之后随着 pH 的升高亚铁螯合率开始下降。水解度与亚铁螯合率呈现一定的相关性,也是随着 pH 的升高呈现先增加后降低的趋势,在 pH = 11 时水解度达到最佳,为 $31.22\% \pm 0.26\%$,此时亚铁螯合率为 $61.27\% \pm 0.65\%$ 。赵聪等^[24]在研究灰树花蛋白酶解工艺的试验中研究结果与本实验类似,随着 pH 的升高,亚铁螯合能力和水解度也均呈现先升高后降低的趋势。酶解反应体系中 pH 的改变会直接影响蛋白酶分子的空间结构、底物分子的解离状态以及酶与底物的结合,从而致使水解度发生变化,影响酶解产物的螯合活性^[25-26]。另外研究表明,过高的 pH 意味着溶液中 OH^- 离子增加,游离铁离子与 OH^- 结合形成羟合 Fe^{2+} 的机会增加,也不利于螯合铁的生成^[27]。同时在 pH 为 11 时,亚铁螯合率和水解度达到最高,所以本实验中选择 pH = 11 作为最佳酶解 pH。

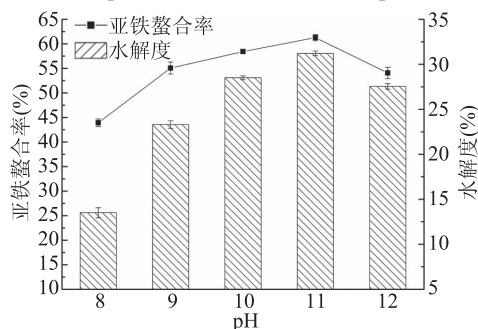


图2 pH 对亚铁螯合率和水解度的影响

Fig.2 Effect of pH on iron-chelating rate and DH

2.1.3 酶解温度对亚铁螯合率和水解度的影响 温度对亚铁螯合率和水解度的影响如图 3。温度在 40~50 $^{\circ}$ C 范围内,亚铁螯合率随着温度的上升明显增强,在 50~60 $^{\circ}$ C 范围内,亚铁螯合率呈下降趋势。在 50 $^{\circ}$ C 时亚铁螯合率达到最大,为 $53.59\% \pm 1.10\%$,此时水解度为 $29.20\% \pm 0.57\%$ 。张墨楠^[28]在探究不同温度对大豆蛋白酶解液亚铁螯合反应的影响时,结果发现当温度为 37 $^{\circ}$ C 时亚铁螯合活性最

高,过高或过低的温度都不利于亚铁的螯合。随着温度的升高,水解度先升高,之后变化不明显。当温度较低时,酶和蛋白分子的运动速率均较低,不利用反应的进行;当温度过高时,会导致酶活性减弱甚至丧失,抑制反应的正向进行^[29-30]。所以,为获得具有高亚铁螯合活性的鸭血酶解产物,选择温度 50℃ 为最优酶解温度。

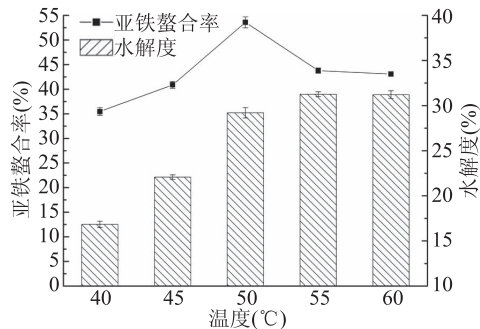


图3 温度对亚铁螯合率和水解度的影响

Fig.3 Effect of temperature on iron-chelating rate and DH

2.1.4 酶解时间对亚铁螯合率和水解度的影响 不同酶解时间对亚铁螯合率和水解度的影响如图4所示。由图4可知,亚铁螯合率随着酶解时间的延长先升高后降低,在2 h时达到最大值,为 $61.46\% \pm 0.43\%$ 。水解度在1.5~3 h内随着酶解时间的增加而不断升高,之后再增加酶解时间水解度变化不大。一般多肽与金属的螯合反应都在较短时间内完成,所以在2 h时酶解产物的亚铁螯合率达到最高^[28]。王铮等^[31]利用酶解法制备雁血多肽,在探究酶解工艺对水解度的影响时发现,当酶解时间达到一定程度时,此后再增加反应时间,水解度几乎不再增加。随着酶解时间的增加,水解度一直呈上升趋势,尤其在前2 h内,水解度上升较多。但随着时间的延长,反应产物积累,抑制了蛋白酶的活力,从而导致水解度上升不明显,同时过度水解会不利于亚铁螯合反应。所以选择2 h为最佳酶解时间。

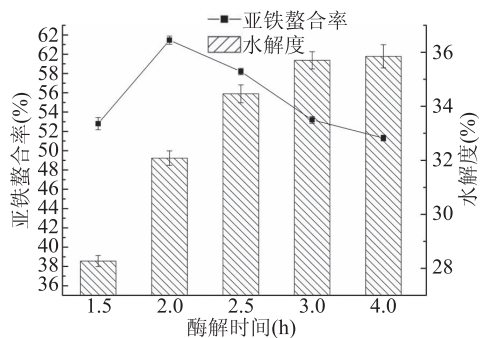


图4 时间对亚铁螯合率和水解度的影响

Fig.4 Effect of time on iron-chelating rate and DH

2.2 响应面优化实验设计及结果

2.2.1 响应面实验结果 综合以上单因素实验结果与分析,以亚铁螯合率为指标,应用 Design Expert 8.0.6 软件设计三因素三水平优化实验,测定结果如表2所示,共计17组实验。

2.2.2 回归模型与方差分析 利用 Design-Expert V8.0.6 软件对响应面实验测定结果(表2)进行多元回归拟合得到亚铁螯合率回归方程: $Y = 62.55 + 4.73X_1 + 4.7X_2 + 1.6X_3 + 4.16X_1X_2 - 0.19X_1X_3 - 0.83X_2X_3 - 12.53X_1^2 - 3.02X_2^2 - 9.71X_3^2$,由表3可知,该回归模型极显著($P < 0.01$)。Adjusted R^2 为0.9599,表明该模型能解释95.99%的响应值变化。失拟误差的 P 值为 $0.1883 > 0.05$,说明回归方程拟合度较高,可用此模型预测各因素对亚铁螯合率的影响。回归模型中,二次项 X_3^2 影响显著($P < 0.05$),一次项 X_1 、 X_2 ,二次项 X_1^2 和 X_3^2 ,交互项 X_1X_2 影响极显著($P < 0.01$),其中各因素对指标的响应值可通过 F 值来判定, F 值越大,影响越显著。根据 F 值大小得到三因素对亚铁螯合率的影响大小顺序为:酶添加量 $>$ 酶解温度 $>$ 酶解时间。

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 The design and results of response surface experiment

实验号	X_1	X_2	X_3	亚铁螯合率(%)
1	-1	-1	0	39.89
2	1	0	-1	42.66
3	0	0	0	61.46
4	1	1	0	62.43
5	1	0	1	44.55
6	1	-1	0	43.87
7	0	0	0	64.78
8	-1	0	1	38.33
9	-1	1	0	41.8
10	0	-1	1	48.43
11	0	1	-1	52.87
12	0	0	0	60.98
13	-1	0	-1	35.68
14	0	-1	-1	42.64
15	0	1	1	55.32
16	0	0	0	61.99
17	0	0	0	63.53

2.2.3 响应面交互作用分析 影响亚铁螯合率各因素交互作用响应面如图5所示。通常来说,两个因素间交互作用的显著性与响应面曲线的弯曲程度和等高线的形状有关,等高线为椭圆型则表示两个因素之间交互作用显著,响应面曲线越陡峭表示单个因素影响越显著,反之表示不显著^[32]。由图A2可以看出,酶添加量与酶解温度交互作用极显著($P < 0.01$)。其中,沿 X_1 轴方向的响应面坡度明显比沿 X_3 轴方向的要陡峭(图A1),说明酶添加量相对于酶解时间对亚铁螯合率影响更为显著。图A3显示沿 X_2 轴方向的响应面坡度明显比沿 X_3 轴方向的要陡峭,说明酶解温度影响更大。从 X_1 与 X_2 交互作用图中发现沿 X_2 轴方向的响应面坡度比沿 X_1 轴稍微平缓一些,说明酶解温度的变化对响应值的影响更为小一些。该结论与方差分析结果一致,再次验证了响应面模型的可靠性。

表3 回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	备注
回归模型	1640.02	9	182.22	43.55	<0.0001	**
X ₁	178.7	1	178.7	42.71	0.0003	**
X ₂	176.63	1	176.63	42.22	0.0003	**
X ₃	20.42	1	20.42	4.88	0.0629	
X ₁ X ₂	69.31	1	69.31	16.56	0.0047	**
X ₁ X ₃	0.14	1	0.14	0.035	0.8579	
X ₂ X ₃	2.79	1	2.79	0.67	0.4411	
X ₁ ²	661.08	1	661.08	158.01	<0.0001	**
X ₂ ²	38.41	1	38.41	9.18	0.0191	*
X ₃ ²	397.21	1	397.21	94.94	<0.0001	**
残差	29.29	7	4.18			
失拟误差	19.39	3	6.46	2.61	0.1883	
净误差	9.9	4	2.47			
总和	1669.31	16				

注: $R^2=0.9825$, Adjusted $R^2=0.9599$, Predicted $R^2=0.8049$, Adequate Precision = 18.330, * 代表显著水平 ($P<0.05$), ** 代表极显著水平 ($P<0.01$)。

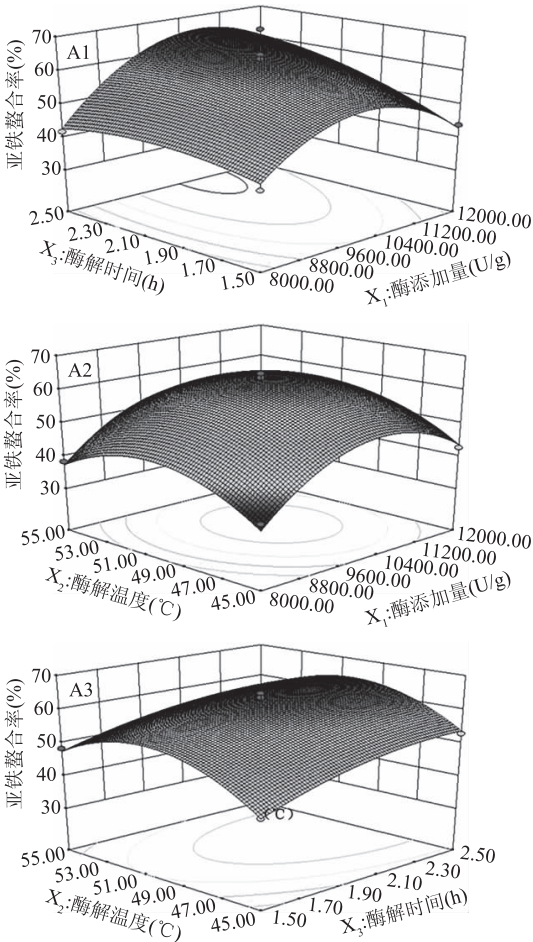


图5 各因素交互作用对亚铁螯合率影响的响应面图
Fig.5 Response surface for the interactive effects of various factors on iron-chelating rate

2.2.4 最佳酶解条件的确定及验证 利用 Design Expert 软件的优化,得到最佳工艺参数:酶添加量 9800 U/g,酶解时间为 2.05 h,温度为 49.6 ℃。考虑到实际操作情况,将酶解条件修正为:酶添加量 9800 U/g,酶解时间为 2 h,温度为 50 ℃。为验证优化后模型的可靠性,做 3 次平行实验,得到实际平均亚铁螯合活性为 65.36%,模型预测的亚铁螯合率为 66.71%。实际结果与预测数值差异为 1.35%,未超过 5%,该模型验证合理。

2.3 鸭血酶解产物分子量分布

鸭血酶解产物分子量分布结果如图 6 和表 4 所示。相比于大分子蛋白质和单一氨基酸,小分子多肽更易被人体吸收利用,所以对酶解液分子量分布的考察极为重要^[33]。由图 6 和表 4 可知,经过碱性蛋白酶酶解后得到的鸭血酶解产物,其相对分子质量小于 1500 Da 的组分占比为 72.01%,其中小于 800 Da 的组分占比为 39.66%。Vattem 等^[34]、Guo 等^[6]、Lee 等^[35]利用酶解技术分别从蛋清蛋白源、阿拉斯加鳕鱼皮和猪血浆蛋白制备得到铁螯合肽,其分子量均小于 1500 Da。此外,Cian 等^[36]从酶解红藻蛋白中制备得到两个多肽组分,分子量分别为 270 和 1013 Da,其中 270 Da 的多肽比 1013 Da 的多肽亚铁螯合活性更强。以上研究表明,多肽的分子量大小与金属的螯合能力有着一定的相关性,低分子量多肽具有相对更强的螯合能力^[37]。

表4 不同分子量分布

Table 4 Different molecular weight distributions		
分子量范围 (Da)	保留时间 (min)	峰面积百分比 (% ,λ ₂₂₀)
>2500	27.478	9.49
1500~2500	26.115	18.50
800~1500	25.038	32.35
<800	24.235	39.66

注:其中 A1、A2、A3 分别表示酶解时间 X₃ 和酶添加量 X₁、酶解温度 X₂ 和酶添加量 X₁、酶解温度 X₂ 和酶解时间 X₃ 对亚铁螯合率的交互作用。

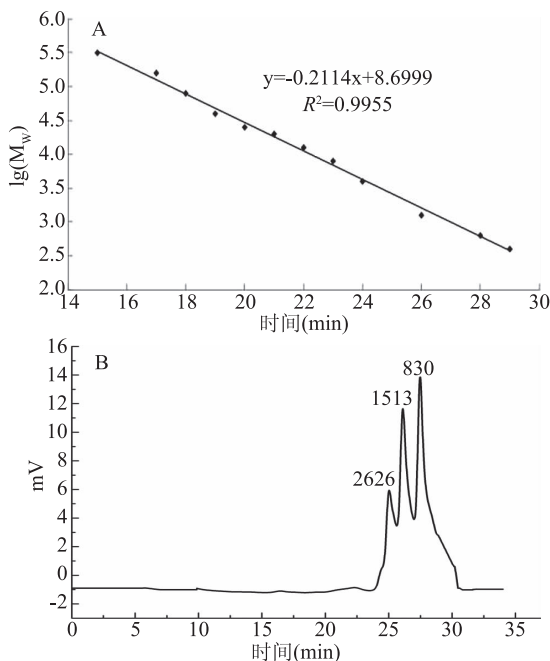


图6 标准蛋白曲线和酶解液分子量分布图
Fig.6 Standard protein curve and molecular weight distribution of hydrolysate

注:图 A 为标准蛋白保留时间与 lg(M_w) 线性关系图;
图 B 为鸭血酶解液分子量分布图,
图中数值代表 M_p 值(最高位峰的分子量)。

2.4 鸭血酶解产物氨基酸组成分析

酶解产物的螯合活性不仅取决于肽的分子量大小,它和组成多肽的氨基酸序列及其中的特殊基团也有很大的关系^[38]。由表 5 可知,酶解产物中氨基酸总量约占 76.25%。其中 Lys、Glu、Asp、His 含量较高,分别占总氨基酸含量的 10.25%、13.95%、9.67%、8.89%。Wu 等^[39]研究鳕鱼皮明胶水解物的氨基酸组成发现,除了 Gly、Pro、Ala 含量较高,与金属螯合活性有关的 Lys、Glu、Asp、His 分别占氨基酸总量的 2.7%、9.0%、5.7%、1.3%。Glu 和 Asp 因具有环状结构能够与亚铁等金属离子结合,形成稳定的金属螯合物^[40]。不同的氨基酸对铁螯合活性的贡献与原料的种类有一定的关系。如在乳清蛋白酶解产物中,Ala、Lys 和 Phe 对铁螯合活性贡献最大^[41]。Lucia 等^[42]在研究酵母蛋白亚铁螯合肽时发现,His、Lys 和 Arg 含量较水解物中有所提高。此外,酶的选择和酶解过程的控制都会影响最终酶解产物的氨基酸组成分布。碱性蛋白酶为非特异性蛋白酶,其酶切的肽段中 Glu、Lys 等氨基酸含量较多,因此具有较高的亚铁螯合活性^[6,24]。有研究发现,具有较好亚铁螯合能力的多肽通常还与 Cys、Arg、Ser 等氨基酸有着紧密的联系^[39,43]。通过氨基酸组成分析发现,碱性蛋白酶作用于鸭血蛋白形成的小分子多肽具有良好的亚铁螯合活性。

3 结论

本试验以亚铁螯合率为指标,结合单因素实验和响应面试验优化得到碱性蛋白酶水解鸭血制备具有高亚铁螯合活性的酶解产物的最优酶解工艺为:

表 5 酶解产物氨基酸组成分析
Table 5 Analysis of amino acid composition of hydrolysate (mg/g)

氨基酸组成	酶解产物(mg/g)
天冬氨酸 Asp	73.76
苏氨酸 Thr	30.54
丝氨酸 Ser	27.79
谷氨酸 Glu	106.39
脯氨酸 Pro	32.83
丙氨酸 Ala	45.06
甘氨酸 Gly	27.79
半胱氨酸 Cys	14.60
缬氨酸 Val	38.35
蛋氨酸 Met	18.93
异亮氨酸 Ile	30.64
亮氨酸 Leu	67.95
酪氨酸 Tyr	25.71
苯丙氨酸 Phe	36.44
赖氨酸 Lys	78.14
组氨酸 His	67.80
精氨酸 Arg	39.77
合计	762.49

酶添加量为 9800 U/g、温度为 50 ℃、pH11、时间为 2 h,在此工艺下模型预测亚铁螯合率为 66.71%,实际亚铁螯合率可达 65.36%,实际结果与预测值之间的误差为 1.35%,模型验证合理。酶解产物中分子量低于 1500 Da 的小肽占比为 72.01%,氨基酸组成分析发现,酶解产物中具有亚铁螯合活性多肽的氨基酸(Lys、Glu、Asp、His)含量较高,分别占总氨基酸含量的 10.25%、13.95%、9.67%、8.89%,这些氨基酸对亚铁离子有较强的螯合作用。本研究结果为进一步开发鸭血等畜禽血液铁螯合肽提供了理论依据。

参考文献

[1]耿永然,汪建明,鲁绯.鸭血豆腐感官品质评价指标筛选[J].食品工业科技,2015,36(23):95-98.
[2]陈尚卫,徐为民,陈菲,等.超声波破壁工艺对鸭血豆腐营养品质的影响[J].江苏农业科学,2012,40(7):238-239.
[3]孙月萍,李鹏,孙京新,等.魔芋胶和瓜尔豆胶对鸭血豆腐食用品质的影响[J].肉类研究,2018,32(6):35-39.
[4]王道营,张牧烺,卞欢,等.超声波工艺对鸭血豆腐质量的影响(英文)[J].农业科学与技术(英文版),2014,15(4):616-619,626.
[5]陈晓,时海波,杨恒,等.畜禽副产物蛋白质及其水解物的美拉德反应在食品加工中的应用[J].食品安全质量检测学报,2019,10(13):4272-4277.
[6]Guo L, Hou H, Li B, et al. Preparation, isolation and identification of iron - chelating peptides derived from Alaska pollock skin[J].Process Biochemistry,2013,48(5-6):988-993.
[7]原洪,柴丽琴,王立霞,等.花椒籽肽-铁螯合物的制备及其理化性质[J].食品与发酵工业,2018,44(6):164-171.
[8]杨玉蓉.西藏野桃仁酶解多肽的生物活性及其亚铁螯合

物的研究[D].长沙:中南林业科技大学,2019.

[9]李玉珍,肖怀秋,赵谋明,等.冷榨花生粕蛋白多肽-亚铁螯合物制备工艺优化及结构分析[J].中国粮油学报,2017,32(4):64-69.

[10]胡乔迁,曹晖,葛林丽,等.芝麻蛋白肽亚铁螯合物的制备工艺优化[J].美食研究,2018,35(3):54-59.

[11]吴卓夫,李萌,张斯童,等.木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶水解制备绿豆多肽[J].吉林大学学报:理学版,2018,56(4):1029-1034.

[12]唐霄,孙杨赢,江雪婷,等.不同蛋白酶制备鹅肉呈味肽的对比分析[J].食品科学,2019,40(22):141-146.

[13]赵静.猪血红蛋白铁螯合肽的制备及性质研究[D].长春:吉林大学,2016.

[14]杨雪松,孙杨赢,潘道东,等.阿拉伯胶、瓜尔豆胶复配对鸭血凝胶特性的影响[J].食品科学,2018,39(5):26-32.

[15]王攀峰.马鲛鱼加工副产物酶促水解制备铁结合肽的研究[D].杭州:中国计量学院,2014.

[16]Adler-Nissen J.Enzymic hydrolysis of food proteins[M].Elsevier Applied Science Publishers,1986.

[17]GB/T 6432-2018:饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法[S].

[18]周娟娟,王海滨,柯雪梅,等.碱性蛋白酶水解鸭血工艺条件的研究[J].粮食与饲料工业,2007(3):42-44.

[19]Torres-Fuentes C,Alaiz M,Vioque J.Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides[J].Food Chemistry,2012,134(3):1585-1588.

[20]Sun N,Cui P,Jin Z,et al.Contributions of molecular size, charge distribution, and specific amino acids to the iron-binding capacity of sea cucumber(*Stichopus japonicus*) ovum hydrolysates[J].Food Chemistry,2017,230:627-636.

[21]GB/T 5009.124-2016 食品中氨基酸的测定[S].

[22]王柱,史腾轩,王思宇,等.响应面优化小麦淀粉抗老化酶解工艺[J].食品研究与开发,2019,49(17):116-122.

[23]林海燕,王珊珊,孙珊,等.响应面法优化南极磷虾亚铁螯合肽制备工艺及其理化性质[J].食品工业科技,2019,40(21):166-173.

[24]赵聪,程晨,尹诗语,等.基于亚铁螯合能力的灰树花蛋白酶解工艺优化及其抗氧化活性[J].食品科学,2018,39(2):73-79.

[25]吕小京,操德群,徐年军.响应面法优化酶解法制备海洋微藻微拟球藻抗氧化肽工艺[J].食品科学,2018,39(6):183-188.

[26]王雨生,陈海华,王莹钰,等.超声波协同酶法制备香菇酶液及其鲜味物质研究[J].中国食品学报,2015,15(9):134-141.

[27]郑炯.血红蛋白多肽螯合铁的制备及其抗贫血功能研究[D].重庆:西南大学,2008.

[28]张墨楠.酶促水解大豆分离蛋白制备铁螯合肽的研究[D].杭州:中国计量学院,2013.

[29]衣美艳,侯虎,毛毛,等.响应面优化庸鲈鱼骨酶解条件及其酶解物氨基酸组成分析[J].食品工业科技,2019,40

(22):175-180,186.

[30]Duan R,Zhang J,Du X,et al.Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Food Chemistry,2009,112(3):702-706.

[31]王铮,赵宇,高晓晨,等.鸿雁雁血多肽的制备及免疫调节作用的初步研究[J/OL].食品工业科技:1-11[2020-03-13].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20200215.2004.004.html>.

[32]Rodríguez-González V,Femenia A,Minjares-Fuentes R,et al.Functional properties of pasteurized samples of *Aloe barbadensis* Miller: Optimization using response surface methodology[J].LWT-Food Science and Technology,2012,47(2):225-232.

[33]杨贵兰,秦松,王晓艳,等.酶法制备阿拉斯加鳕鱼降压肽的工艺优化及其产物的结构鉴定[J/OL].食品工业科技:1-16[2020-03-06].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20191008.1340.012.html>.

[34]Vattem D A,Mahoney R R.Production of dialysable iron by *in vitro* digestion of chicken muscle protein fractions:The size of the dialysable iron[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2005,85(9):1537-1542.

[35]Lee S H,Song K B.Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein[J].Process Biochemistry,2009,44(3):378-381.

[36]Cian R E, Garzón A G, Ancona D B, et al. Chelating properties of peptides from red seaweed *Pyropia columbina* and its effect on iron bio-accessibility[J]. Plant Foods for Human Nutrition,2016,71(1):96-101.

[37]李雪芬,杜斌,丁轲,等.金属螯合肽分离纯化及其抗氧化活性的研究进展[J].中国食物与营养,2016,22(3):35-39.

[38]Guo L,Harnedy P A,Li B,et al.Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement[J].Trends in Food Science & Technology,2014,37(2):92-105.

[39]Wu W,Li B,Hou H,et al.Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode[J].Journal of Functional Foods,2017,35:418-427.

[40]Zachariou M,Hearn M T W.Application of immobilized metal ion chelate complexes as pseudocation exchange adsorbents for protein separation[J].Biochemistry,1996,35(1):202-211.

[41]Kim S,Seo I,Khan M,et al.Enzymatic hydrolysis of heated whey: Iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions[J].Journal of Dairy Science,2007,90(9):4033-4042.

[42]De La Hoz L,Ponezi A N,Milani R F,et al.Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides[J].Food Chemistry,2014,142:166-169.

[43]Lv Y,Liu Q,Bao X,et al.Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe³⁺[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2009,57(11):4593-4597.