

罗非鱼鳞胶原肽亚铁螯合物制备工艺 优化及结构表征

Optimization of preparation technology and structural characterization of tilapia scale collagen peptide ferrous chelate

唐顺博^{1,2} 涂宗财^{1,2,3} 沙小梅^{1,2} 张耀^{1,2} 张露^{1,2}

TANG Shun-bo^{1,2} TU Zong-cai^{1,2,3} SHA Xiao-mei^{1,2} ZHANG Yao^{1,2} ZHANG Lu^{1,2}

(1. 江西师范大学国家淡水鱼加工技术研发专业中心, 江西 南昌 330022;

2. 江西师范大学江西省淡水鱼高值化利用工程技术研究中心, 江西 南昌 330022;

3. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

(1. Jiangxi Normal University National Freshwater Fish Processing Technology R & D Professional Center, Nanchang, Jiangxi 330022, China; 2. Jiangxi Normal University Jiangxi Province Freshwater Fish High-value Utilization Engineering Technology Research Center, Nanchang, Jiangxi 330022, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China)

摘要:以罗非鱼鳞胶原肽与氯化亚铁盐为原料制备多肽亚铁螯合物, 并对其最佳螯合条件及螯合物结构进行探究。以螯合物得率为指标通过单因素和响应面法对螯合条件进行优化; 通过扫描电镜、傅里叶红外光谱、X 衍射和氨基酸分析等方法对螯合物结构及氨基酸组成进行分析。结果表明, 制备螯合物的最佳反应条件为 pH 5.30, 多肽浓度 3.00%, 多肽与铁质量比 3.2 : 1.0, 该条件下螯合率为 82%, 螯合物得率为 65.43%; 通过氨基酸组成分析表明, 氨基酸组成符合胶原多肽的成分特征, 螯合后天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、组氨酸和精氨酸含量增加; 扫描电镜、红外光谱以及 X 衍射等结果表明多肽与亚铁盐以配位键结合成多肽亚铁螯合物。

关键词: 罗非鱼; 鱼鳞; 胶原肽; 亚铁螯合物; 结构表征

Abstract: The peptide ferrous chelate was prepared using tilapia scale collagen peptide and ferrous chloride salt as raw materials, and its optimal chelating conditions and chelate structure were investigated. Using chelate yield as an indicator, the chelation conditions were optimized by single factor and response surface methods; The structure and amino acid composition of the

chelate were analyzed by scanning electron microscope, Fourier infrared spectroscopy, X-ray diffraction and amino acid analysis. The results showed that the optimal reaction conditions for preparing the chelate were pH 5.30, peptide concentration 3.00%, and peptide to iron mass ratio 3.2 : 1.0. Under these conditions, the chelation rate was 82% and the chelate yield 65.43%; The analysis of amino acid composition showed that the amino acid composition accorded with the composition characteristics of collagen polypeptide, and the content of aspartic acid, glutamic acid, lysine, histidine and arginine increased after chelation; Diffraction and other results showed that the peptide and ferrous salt were combined by a coordination bond to form a peptide ferrous chelate.

Keywords: tilapia; fish scale; collagen peptide; peptide ferrous chelate; structural characterization

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓”科技创新专项项目(编号: 2018YFD0901101); 国家现代农业产业技术体系建设专项基金项目(编号: CARS-45); 江西省重点研发计划项目(编号: 20192ACB60005)

作者简介: 唐顺博, 男, 江西师范大学在读硕士研究生。

通信作者: 涂宗财(1965—), 男, 江西师范大学教授, 博士生导师, 博士。E-mail: Tuzc_mail@aliyun.com

收稿日期: 2020-04-30

铁为人体必需元素, 在维持正常造血功能和增强免疫功能等方面起到巨大作用^[1]。世界上约有 25% 的人患有贫血, 其中一半是缺铁造成的, 口服补铁剂是治疗缺铁性贫血的重要方法之一, 但传统硫酸亚铁复合剂可能会导致患者肠胃不适^[2]。研究发现, 氨基酸铁螯合物比传统硫酸亚铁复合剂具有更好的补血效果^[3], 多肽亚铁螯合物作为一种新型补铁剂, 可通过肽的转运系统直接被人体吸收, 并且对人体刺激较小, 有希望用于一些特殊人群^[4-5]。

明胶是一种多功能性的生物大分子, 普遍用于食品、医药及化工领域^[6-8]。与传统明胶相比, 鱼明胶具有来

源广,价格低,营养价值高等特点。随着近年水产养殖的发展,鱼类加工副产物如鱼鳞、鱼头、鱼内脏等资源被大量浪费,充分利用加工副产物能大大提高鱼类的综合价值^[9]。沙小梅等^[10]从鲮鱼鱼鳞中提取鱼鳞明胶并研究了提取过程中 pH 值对鲮鱼鱼鳞明胶性质的影响;Sinthusamran 等^[11]研究了不同提取温度对鲈鱼鱼皮明胶性质的影响。罗非鱼别称非洲鲫鱼,肉质鲜嫩,富含多种营养物质,是中国鱼类养殖中的重要品种^[12],贾杏歌等^[13]研究了不同浓度戊二醛对罗非鱼鳞胶原蛋白机械性和抗水性的影响;李瑞杰等^[14]比较了不同酶解物的钙离子螯合能力和螯合物的抗氧化活性。刘永等^[15]曾对罗非鱼鳞胶原蛋白肽铁螯合物的制备工艺进行了优化,但未对螯合物结构进行探究。

研究拟以罗非鱼鳞胶原肽为原料制备多肽亚铁螯合物,并对多肽亚铁螯合物的最佳制备工艺及其结构进行探索,以期对罗非鱼鱼鳞的精深加工及高值化利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

罗非鱼鳞明胶:苏州吉利鼎海洋生物科技有限公司;

碱性蛋白酶:酶活力为 8.68×10^7 U/g,诺维信酶制剂公司;

乙腈、三氟乙酸:色谱纯,上海阿拉丁生化科技有限公司;

细胞色素 C、抑肽酶、L-氧化型谷胱甘肽、羟脯氨酸:色谱纯,北京索莱宝科技有限公司;

其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SevenCompact 台式 pH 计:S220 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

冷冻干燥机:SR-AON-50 型,上海舍岩仪器有限公司;

HSM 高效液相色谱:D-2000 型,日本 Hitachi 公司;

酶标仪:Synergy H1 型,美国 Bio Tek 公司;

氨基酸分析仪:L-8900 型,日本 Hitachi 公司;

智能型傅立叶变换红外光谱仪:Nicolet5700 型,美国热电尼高力公司;

扫描电镜:S-3400N 型,日本 Hitachi 公司;

X 射线衍射仪:D8 ADVANCE 型,德国 BRUKER 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 鱼鳞多肽的制备 酶解方法参考文献^[16]修改如下:取鱼鳞明胶加蒸馏水配成浓度为 5% 的明胶溶液,置于 50 °C 恒温水浴锅中保温 15 min,用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 8,加入明胶质量比为 1% 的碱性蛋白酶水浴 30 min,再次调节 pH 至 8,水解 4.5 h,水解结束后立即沸

水浴 10 min 灭活,冷却,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液,经冷冻干燥后存于 4 °C 冰箱备用。

1.3.2 多肽分子量测定 按照 GB 31645—2018《食品安全国家标准 胶原蛋白肽》对多肽分子量进行测定。取 1.3.1 中多肽粉配制 1 mg/mL 的溶液,过 0.22 μm 水系滤膜后,使用高效液相色谱仪进行分析。以细胞色素 C (12 384 Da)、抑肽酶 (6 511.51 Da)、L-氧化型谷胱甘肽 (612.63 Da) 和羟脯氨酸 (131.13 Da) 为标准品绘制相对分子质量校正曲线。色谱条件:色谱柱型号为 XBridge BEH 125 Å SEC (3.5 μm, 7.8 mm × 300 mm);流动相比比例为 $V_{\text{乙腈}} : V_{\text{水}} : V_{\text{三氟乙酸}} = 40 : 60 : 0.05$;流速 0.5 mL/min;柱温 30 °C;进样量 10 μL。

1.3.3 多肽亚铁螯合物制备工艺优化

(1) 亚铁螯合物的制备流程:

多肽 → 加入一定比例水 → 加入抗氧化剂 (抗坏血酸) → 调节 pH 值 → 按比例加入铁盐 → 进行螯合反应 → 加入无水乙醇沉淀 → 离心得到沉淀 → 冷冻干燥^[17]

(2) 单因素试验:由于亚铁螯合受 pH、多肽浓度及多肽与亚铁盐质量比影响较大^[18],因此试验固定反应温度为 25 °C,反应时间为 40 min, pH 为 5.0,多肽浓度为 3%,多肽与亚铁盐质量比为 3:1,依次对 pH 值 (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0),多肽浓度 (1%, 2%, 3%, 4%, 5%),多肽与亚铁盐质量比 (1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1) 进行单因素试验,以螯合率和螯合物得率为指标,探讨单因素对螯合反应的影响。

(3) 响应面试验设计:根据单因素试验结果,以 pH 值、多肽与铁盐质量比和多肽液浓度为影响因素,设计三因素三水平响应面试验,以多肽螯合物得率为评价指标,探索螯合物的最佳制备工艺。

1.3.4 评价指标的测定 采用邻菲罗啉比色法^[17]评价肽—铁螯合体系中亚铁离子的含量、铁螯合率和螯合物得率。

(1) 铁离子含量:

$$F = \frac{C \times V_2}{M \times V_1}, \quad (1)$$

式中:

F ——体系铁离子含量,mg/kg;

C ——从标准曲线获得溶液相应的铁含量,μg;

M ——称取样品的质量,g;

V_1 ——测定所取的溶液体积,mL;

V_2 ——样品处理后的定容体积,mL。

(2) 铁螯合率:

$$D = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

D ——铁螯合率,%;

m_1 ——螯合物中铁的含量,mg;

m_2 ——加入铁的含量,mg。

(3) 螯合物得率:

$$Y = \frac{M_1}{M_2} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

Y ——螯合物得率,%;

M_1 ——生成物总质量,g;

M_2 ——加入反应体系的总质量,g。

1.3.5 氨基酸组成分析 参照 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》,采用氨基酸自动分析仪对样品中氨基酸的含量进行测定。

1.3.6 多肽亚铁螯合物的结构表征

(1) 扫描电镜分析:取少量样品,均匀涂在样品盘的导电胶上进行喷金处理,之后采用 S-3400N 型扫描电子显微镜进行扫描,对其表现形貌进行分析。

(2) 红外光谱分析:采用 Nicolet 5700 型红外光谱仪测定多肽与多肽亚铁螯合物的红外光谱,扫描范围为 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 。

(3) X 衍射分析:将样品研磨均匀后,采用 Bruker D8 X-射线衍射仪进行分析测定,分析条件为:Cu 靶,管电流 40 mA,扫描速度 $10^\circ/\text{min}$,扫描角度为 $5^\circ \sim 80^\circ$ 。

1.4 数据处理

所有试验均重复 3 次,试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Origin 8.6 软件作图,采用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面试验设计和数据分析, $P < 0.05$ 表示差异性显著, $P < 0.01$ 表示差异性极显著。

2 结果与分析

2.1 多肽分子量分布

通过对标品出峰时间与标品分子量进行线性拟合,得到分子量标品标准方程为 $Y = 6.855\,16 - 0.249\,9X$ ($R^2 = 0.997$),由图 1 可知,胶原多肽中主要含有 4 个组分,经计算各组分平均分子量分别为 7 479, 5 450, 3 030, 889 Da,符合 GB 31645—2018 标准对多肽的定义。

2.2 单因素试验结果

由图 2(a)可知,当固定多肽液浓度为 3%,多肽与亚铁盐质量比为 3:1 时,螯合率和螯合物得率先升高,在 pH 为 5 时达到最大值,随后又减小,表明反应体系在弱酸或中性时,溶液中的 OH^- 会参与 Fe^{2+} 的反应,不利于螯合反应的进行^[19];由图 2(b)可知,固定 pH 为 5,多肽与亚铁盐质量比为 3:1 时,螯合率先增大后减小,在多肽液浓度为 3% 时,螯合率和螯合物得率最高,这是因为多肽浓度增大,在水中溶解性变小,参与反应的多肽更少;由图 2(c)可知,当固定多肽浓度为 3%,pH 为 5 时,螯合率随亚铁盐质量比的增大而减小,螯合物得率先增大后减小,当质量比为 3:1 时达到最大,可能是由于多肽与亚铁离子的结合位点有限,当结合数目达到最大时,不再发生反应,不能生成螯合物^[20]。

2.3 响应面优化分析

2.3.1 响应面试验设计及结果分析 根据单因素试验结果,选取 pH、多肽浓度、肽铁盐质量比三因素(见表 1),利用 Box-Behnken 中心组合原理设计三因素三水平的响应面试验,试验方案与结果见表 2。

用 Desgin-Exper 8.0 软件对表 2 的试验结果进行分析,建立螯合物得率(Y)的二次响应面回归模型为:

$$Y = 1.15A + 0.75B + 0.80C - 0.05AB + 0.28AC - 0.89BC - 2.00A^2 - 3.44B^2 - 2.12C^2 + 65.83. \quad (4)$$

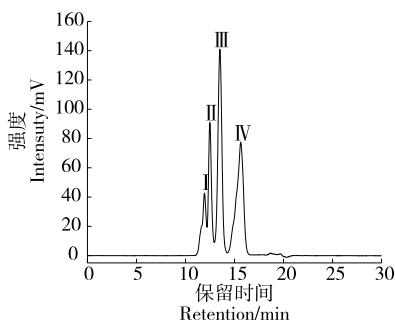


图 1 胶原多肽分子量分布

Figure 1 Collagen peptide molecular weight distribution

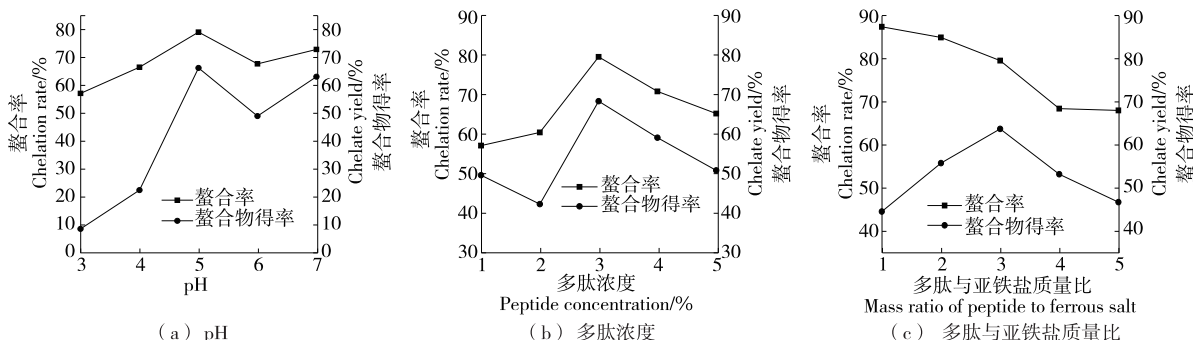


图 2 pH、多肽浓度和多肽与铁盐质量比对螯合反应的影响

Figure 2 Effect of pH, peptide-ferrous chloride ratio and peptide concentration on chelation reaction

根据表 3 中方差结果分析,该二次模型 P 值 $< 0.000 1$ 表明极显著,相关系数 R^2 为 $0.979 9$,表明预测值和实测值之间有很高的相关性, R_{Adj}^2 为 $0.954 1$,表明此模型能解释 95.41% 的响应值变化,因此该模型可以较好地描述 pH 值、多肽液浓度和多肽与铁盐质量比对螯合反应影响的变化规律。

表 1 响应面因素及水平表

Table 1 Factors and level of Box-Behnken test

编码值	A pH	B 多肽与铁盐质量比	C 多肽液浓度/%
-1	4	2 : 1	2
0	5	3 : 1	3
1	6	4 : 1	4

表 2 响应面试验方案与结果

Table 2 Response surface experimental scheme and results

试验号	A	B	C	Y 螯合物得率/%
1	0	0	0	65.78
2	0	-1	1	61.72
3	-1	0	1	60.92
4	-1	1	0	59.90
5	0	0	0	66.42
6	1	0	-1	61.95
7	-1	-1	0	58.12
8	0	0	0	65.58
9	1	0	1	63.31
10	0	1	1	61.23
11	1	1	0	62.57
12	-1	0	-1	60.67
13	0	1	-1	60.61
14	0	0	0	64.39
15	0	-1	-1	57.52
16	1	-1	0	60.99
17	0	0	0	65.99

回归方程的各项方差分析结果表明,A、B、C、 A^2 、 B^2 和 C^2 对螯合物得率的影响极显著($P < 0.01$),BC 相互作用对螯合物得率的影响显著($P < 0.05$),而 AB、AC 的相互作用对螯合物得率的影响不显著($P > 0.05$)。由 F 值可知,各因素对螯合物得率的影响次序: $pH >$ 肽铁质量比 $>$ 多肽浓度。剔除不显著项 AB、AC 后对方程进行优化,得优化后的方程为:

$$Y = 1.15A + 0.75B + 0.80C - 0.89BC - 2.00A^2 - 3.44B^2 - 2.12C^2 + 65.83.$$
 (5)

由图 3 可知,因素 B 和 C 之间的相互作用等高线图呈椭圆形,表明多肽浓度与肽铁质量比之间具有显著的相互作用^[21],与表 3 结果一致。

2.3.2 最优解的验证 利用 Design-Expert 8.0 软件计算得到肽铁螯合物最佳工艺条件为 $pH 5.29$,多肽浓度

表 3 响应面二次模型方差分析[†]

Table 3 Variance analysis for response surface quadratic model

来源	平方差	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	118.48	9	13.16	37.93	$< 0.000 1$	显著
A	10.60	1	10.60	30.55	0.000 9	* *
B	4.44	1	4.44	12.79	0.009 0	* *
C	5.17	1	5.17	14.89	0.006 2	* *
AB	1.00E-02	1	1.00E-02	0.03	0.870 0	
AC	0.31	1	0.31	0.89	0.377 5	
BC	3.20	1	3.20	9.23	0.018 9	*
A^2	16.80	1	16.80	48.39	0.000 2	* *
B^2	49.82	1	49.82	143.53	$< 0.000 1$	* *
C^2	18.96	1	18.96	54.64	0.000 2	* *
残差	2.43	7	0.35			
失拟	1.80	3	0.60	3.79	0.115 4	不显著
误差	0.63	4	0.16			
总合	120.91	16				

[†] * 为影响显著, $P < 0.05$; * * 为影响极显著, $P < 0.01$; $R^2 = 0.979 9$, $R_{Adj}^2 = 0.954 1$ 。

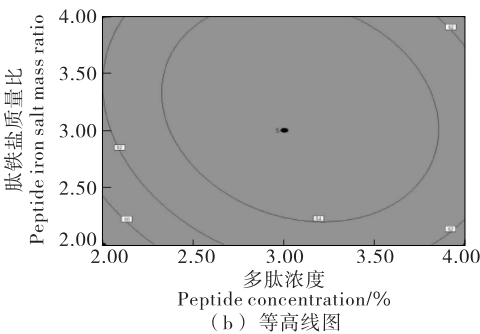
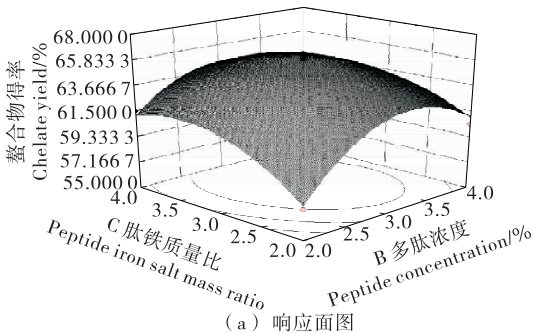


图 3 多肽浓度与肽铁盐质量比的交互作用对螯合物得率影响的响应面图

Figure 3 Response surface plot for the effect of cross-interaction between peptide-ferrous chloride ratio and peptide concentration on chelation efficiency

3.09%,多肽与铁质量比 3.17 : 1.00,预测螯合物得率为 66.10%。考虑到实际操作,最佳制备工艺确定为 pH 5.30,多肽浓度 3.00%,多肽与铁质量比为 3.20 : 1.00,在此条件下进行 3 次重复验证实验,螯合率平均值为 82%,肽铁螯合物得率平均值为 65.43%,与最佳工艺条件螯合物得率 66.10%无显著性差异($P>0.05$),说明此模型可用于反应多肽螯合铁的变化规律。

2.4 氨基酸组成成分分析

由表 4 可知,胶原多肽中 Gly 含量最高,Glu、Pro、Ala 和 Asp 的含量也相对较高,符合胶原蛋白氨基酸组成特征^[22],结合图 1,多肽分子量分布在 800~8 000 Da,因此可认为经酶解后冻干所得粉末为胶原多肽。Glu、Gly、Lys、His 和 Arg 等氨基酸被认为与金属离子螯合活性密切相关^[23-24],从表 4 可知,该 5 种氨基酸在多肽中大量存在,经螯合后,其在螯合物中的含量大量增加,与 Lee 等^[25]的研究结果相符。

2.5 螯合物的结构表征

2.5.1 扫描电镜分析 由图 4 可知,多肽表面光滑并有裂纹,可能是在真空干燥过程中失水导致,而螯合物是主体成球状的团状交织结构,表面有颗粒附着于球体上,与汪婧瑜等^[17]结果类似。

2.5.2 红外光谱分析 由图 5 可知,发生螯合反应后,多

肽和肽铁螯合物的特征吸收峰发生了明显的变化。螯合后,多肽的 $-NH_2$ 吸收峰由 $3\ 380.60\ cm^{-1}$ 移动到 $3\ 370.97\ cm^{-1}$,在 $1\ 542.77\ cm^{-1}$ 处 $-NH_2$ 的吸收峰移动到 $1\ 546.63\ cm^{-1}$,多肽的 $-COO-$ 吸收峰由 $1\ 400.67\ cm^{-1}$ 移动到 $1\ 409.71\ cm^{-1}$,另外多肽的 C—H 吸收峰由于伸缩振动由 $1\ 455.99\ cm^{-1}$ 移动到 $1\ 468.64\ cm^{-1}$,以上结果表明多肽中 $-NH_2$ 、 $-COO-$ 与 C—H 与亚铁盐发生反应生成了多肽亚铁螯合物。

2.5.3 亚铁螯合物的 X 衍射分析 由图 6 可知,鱼鳞胶原肽在 $2\theta=20^\circ$ 左右处出现强衍射峰,与刘静^[26]所测图谱类似,在与亚铁离子螯合后,多肽螯合物在 20° 左右的衍射峰减弱,并且向大掠射角偏移,其他地方未出现衍射峰,属于无规则的非晶体结构,表明亚铁离子与多肽以配位键形式结合。

表 4 多肽与螯合物的氨基酸组成

Table 4 Amino acid composition of peptide and chelating iron %

氨基酸	多肽	螯合物	氨基酸	多肽	螯合物
天冬氨酸(Asp)	5.31	8.49	甲硫氨酸(Met)	1.05	0.46
苏氨酸(Thr)	2.81	2.56	异亮氨酸(Ile)	1.00	0.56
丝氨酸(Ser)	3.90	3.82	亮氨酸(Leu)	2.49	1.16
谷氨酸(Glu)	12.54	15.82	酪氨酸(Tyr)	1.21	1.09
脯氨酸(Pro)	12.70	9.50	苯丙氨酸(Phe)	2.41	1.55
丙氨酸(Ala)	9.28	8.05	赖氨酸(Lys)	3.62	5.15
甘氨酸(Gly)	27.61	28.59	组氨酸(His)	0.88	1.21
半胱氨酸(Cys)	1.13	0.70	精氨酸(Arg)	8.60	9.09
缬氨酸(Val)	3.46	2.20			

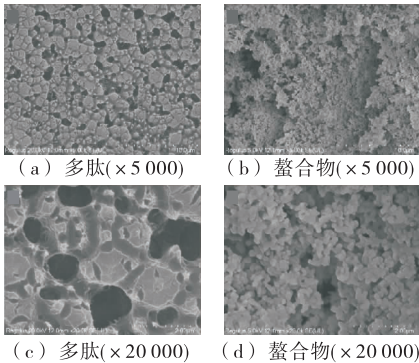


图 4 多肽与螯合物的扫描电镜图

Figure 4 SEM images of peptide and peptide-ironchelate

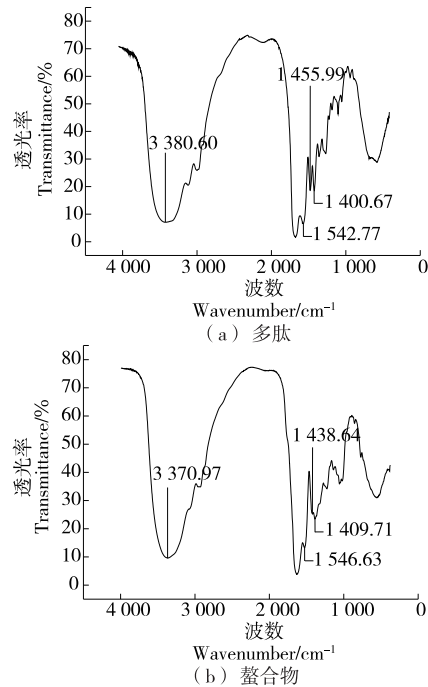


图 5 多肽与螯合物的红外光谱图

Figure 5 Infrared spectra of peptide and peptide-ironchelate

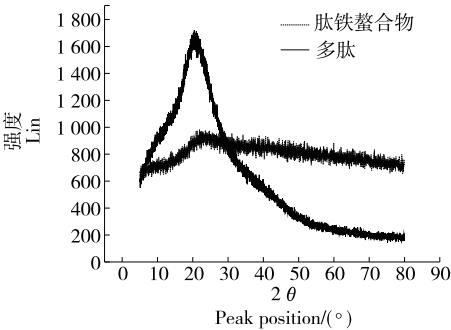


图 6 多肽和螯合物的 X 衍射图谱

Figure 6 XRD of peptides and peptide-ironchelate

3 结论

以鱼鳞胶原肽为原料,以螯合物得率和螯合率为指标,采用单因素试验及响应面法优化得出了多肽亚铁螯合物的最佳制备工艺为 pH 5.30,多肽浓度 3.00%,多肽与亚铁盐质量比 3.2:1.0,在此条件下螯合率为 82%,螯合物得率为 65.43%。氨基酸分析表明 Glu、Gly、Lys、His 和 Arg 等氨基酸在螯合反应中起到重要作用。通过扫描电镜发现多肽与螯合物表面结构发生明显改变,由表面光滑变为球形团状结构;红外光谱表明胶原多肽中的一NH₂、—COO—以及 C—H 与亚铁盐发生了反应;X 衍射图谱分析发现亚铁离子与多肽以配位键的形式结合,证实多肽与亚铁盐发生反应生成了螯合物。以上研究结果表明,鱼鳞胶原肽可作为新型补铁剂载体材料,拓宽了补铁剂材料的来源,同时为鱼类副产物中鱼鳞的精加工提供了思路,有利于促进鱼鳞的高值化利用。后续将采用体外和体内模型研究罗非鱼鳞胶原肽亚铁螯合物的消化稳定性和贮存稳定性,以及促进铁吸收的效果。

参考文献

- [1] 孙长峰, 郭娜. 微量元素铁的生理功能及对人体健康的影响[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 222-225.
- [2] PEREIRA D I, IRVING S S C, LOMER M C. A rapid, simple questionnaire to assess gastrointestinal symptoms after oral ferrous sulphate supplementation[J]. BMC Gastroenterology, 2014, 14(1): 103-110.
- [3] HOU Tao, LIU Wei-wei, SHI Wen, et al. Desalted duck egg white peptides promote calcium uptake by counteracting the adverse effects of phytic acid[J]. Food Chemistry, 2017, 219: 428-435.
- [4] PEREIRA D I A, ASLAM M F, FRAZER D M, et al. Dietary iron depletion at weaning imprints low microbiome diversity and this is not recovered with oral nano Fe(III)[J]. Microbiology Open, 2015, 4(1): 12-27.
- [5] ZIMMERMANN M B, BIEBINGER R, EGLI I, et al. Iron deficiency up-regulates iron absorption from ferrous sulphate but not ferric pyrophosphate and consequently food fortification with ferrous sulphate has relatively greater efficacy in iron-deficient individuals[J]. British Journal of Nutrition, 2011, 105(8): 1 245-1 250.
- [6] ALFARO A D T, BALBINOT E, WEBER C I, et al. Fish gelatin: Characteristics, functional properties, applications and future potentials[J]. Food Engineering Reviews, 2014, 7(1): 33-44.
- [7] KARIM A A, BHAT R. Fish gelatin: Properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(3): 563-576.
- [8] BHAT R, KARIM A A. Towards producing novel fish gelatin films by combination treatments of ultraviolet radiation and

- sugars (ribose and lactose) as cross-linking agents[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(7): 1 326-1 333.
- [9] 蔡路昀, 马帅, 张宾, 等. 鱼类加工副产物的研究进展及应用前景[J]. 食品与发酵科技, 2016, 52(5): 108-113.
- [10] 沙小梅, 涂宗财, 王辉, 等. 提取 pH 对鳙鱼鱼鳞明胶功能性质的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(12): 12-16.
- [11] SINTHUSAMRAN S, BENJAKUL S, KISHIMURA H. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions[J]. Food Chemistry, 2014, 152: 276-284.
- [12] 赵志霞, 吴燕燕, 李来好, 等. 我国罗非鱼加工研究现状[J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 363-367.
- [13] 贾杏歌, 王利强, 孙欣星, 等. 罗非鱼鳞胶原蛋白膜抗水性和机械性能研究[J]. 功能材料, 2017, 48(12): 12 115-12 119.
- [14] 李瑞杰, 胡晓, 李来好, 等. 罗非鱼皮酶解物钙离子结合能力及其结合物的抗氧化活性[J]. 南方水产科学, 2019, 15(6): 106-111.
- [15] 刘永, 叶娟, 韦寿莲. 罗非鱼鳞胶原蛋白肽铁螯合物制备工艺的优化[J]. 精细化工, 2013(7): 45-49.
- [16] LIU Wen-ying, GU Rui-zeng, LIN Feng, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from pilot-scale black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle oligopeptides[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(11): 2 782-2 788.
- [17] 汪婧瑜, 张业辉, 张友胜, 等. 乌鳢短肽螯合铁的制备及其结构特性研究[J]. 现代食品科技, 2018, 34(1): 188-194.
- [18] 汪学荣. 猪血多肽铁螯合盐的制备技术及性质研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008: 54-59.
- [19] 蔡冰娜, 陈忻, 潘剑宇, 等. 响应面法优化鳕鱼皮胶原蛋白肽螯合铁工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 48-52.
- [20] 赵仁英. 锌铁双金属与胶原蛋白螯合规律的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017: 26-27.
- [21] 涂宗财, 唐平平, 郑婷婷, 等. 响应面优化鱼鳔胶原肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(5): 160-166.
- [22] 范鸿冰, 汪之颖, 刘鹏, 等. 鲢鱼骨胶原多肽螯合钙的制备研究[J]. 南方水产科学, 2014, 10(2): 72-79.
- [23] 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.
- [24] ZHU Ke-xue, WANG Xiao-ping, GUO Xiao-na. Isolation and characterization of zinc-chelating peptides from wheat germ protein hydrolysates[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 12: 23-32.
- [25] LEE S H, SONG K B. Purification of an iron-binding nonapeptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(3): 378-381.
- [26] 刘静. 牦牛骨胶原多肽螯合钙的制备研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016: 38-40.