

猪血球蛋白营养分析与水解工艺优化及制备金属螯合肽的研究

Study on nutritional analysis and hydrolysis process optimization of porcine hemoglobin and preparation of metal chelating peptides

孙子怡¹

杨剑婷¹

谢宁宁²

张福生²

SUN Zi-yi¹ YANG Jian-ting¹ XIE Ning-ning² ZHANG Fu-sheng²

(1. 安徽科技学院食品工程学院, 安徽 滁州 239000;

2. 安徽省农业科学院农产品加工研究所, 安徽 合肥 230031)

(1. College of Food Engineering, Anhui University of Science and Technology, Chuzhou, Anhui 239000, China;

2. Institute of Agricultural Products Processing, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031, China)

摘要:以猪血球蛋白为原料,检测其基本营养指标和氨基酸组成,以水解度为指标,研究整合 pH、水解温度和时间等单因素的影响,进一步通过响应面法优化水解制备金属螯合肽。结果表明,猪血球蛋白具有优异的营养特征,且富含多种氨基酸;采用碱性蛋白酶水解猪血球蛋白制备金属螯合肽的最佳工艺为 pH 值 10.69、水解温度 48.50 ℃、水解时间 6.76 h、底物添加量 8%、酶与底物比 ($m_{\text{酶}} : m_{\text{底物}}$) 1 : 250,血球蛋白粉水解度的实测值为 37.83%。采用 ICP-AES 检测猪血球蛋白肽螯合铁、铜、锌的量分别为 343.80, 11.34, 4.53 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词:猪血;血球蛋白;酶解;肽;金属螯合能力

Abstract: Taking the porcine haemoglobin as raw material, the basic nutritional indicators and the amino acid composition were detected. Using the hydrolysis degree as the index, the effects of reaction pH, hydrolysis temperature and reaction time were examined. On the basis of single factor experiment, Box-Behnken central composite design was utilized to optimize the hydrolysis process and preparation of metal chelating peptides. Results showed that the porcine haemoglobin has excellent nutritional

characteristics and is rich in various amino acids. Moreover, the optimized processing were as followed: pH of 10.69, hydrolysis temperature of 48.50 ℃, hydrolysis time of 6.76 h, substrate concentration of 8% and enzyme addition of 1 : 250 by alcalase, and the degree of hydrolysis was 37.83%. ICP-AES was applied for making sure metal chelating activity, while their contents of peptide-metal chelates of iron, copper and zinc were, 343.80 $\mu\text{g/mL}$, 11.34 $\mu\text{g/mL}$ and 4.53 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Keywords: pig blood; haemoglobin; enzymatic hydrolysis; peptide; chelating ability of metal

微量元素补充剂能够有效预防此类缺乏症,其中,第 1~3 代补充剂分别为无机盐类、有机酸盐类和氨基酸螯合物^[1]。此外,由金属螯合肽(Metal Chelating peptide, MCP)与金属离子配位结合生成的肽—金属螯合物,可以作为第 4 代补充剂的良好备选。相比较而言,其具有吸收效率高和无竞争性等优点^[2],是当下研究重点之一。

天然蛋白质的酶解工艺,既是获得金属螯合肽的关键技术手段之一,也是制备肽—金属螯合物的重要前提^[3-5]。卢素珍等^[4]以草鱼鱼鳞为原料,采用双酶法制备多肽,运用响应面法优化获得最佳酶解工艺,使酶解物的水解度得到显著提升,且具有 65.72% 的铁螯合活性。原洪等^[5]以花椒籽蛋白为原料,通过单因素和 Box-Behnken 方法优化酶解工艺,获得最优酶解物的水解度和铁结合能力分别为 7.23% 和 585.66 mg EDTA/g · 蛋白质。王常麟等^[6]运用蚌肉为原料,以螯合率为指标,采用响应面法优化酶解工艺,制得蚌肉肽。

近年来,中国猪肉消费和生猪出栏量均为全球最大,

基金项目:安徽省农业科学院创新团队项目(编号:2020YL079);安徽省农业科学院院所共建团队项目(编号:18C1225);安徽省中央引导地方科技发展专项(编号:201907d06020020)

作者简介:孙子怡,女,安徽科技学院在读硕士研究生。

通信作者:谢宁宁(1984—),男,安徽省农业科学院农产品加工研究所副研究员,博士。E-mail:ningxie512@163.com

杨剑婷(1975—),女,安徽科技学院副教授,博士。

E-mail:yangjt@ahstu.edu.cn

收稿日期:2020-03-22

其中,生猪年均出栏头数约 6 亿^[7]。据估算^[8],每年可产生约 3.0×10^5 t 优质猪血。猪血富含优质蛋白质,经预处理离心,可得到血浆液和血球液,分别占 65% 和 35% 左右^[9]。课题组前期研究^[10-11]表明,猪血和猪血浆均有制备优异金属螯合肽的潜力,可作为微量元素补充剂的良好载体。因此,有必要对猪血球制备金属螯合肽的酶解工艺进行优化,形成系统化的工艺技术集成。

研究拟以猪血血球蛋白为原料,检测其基本营养指标和氨基酸组成,再采用碱性蛋白酶进行酶解,以水解度为考察指标,优化血球蛋白肽的最佳工艺,评估血球蛋白肽的金属螯合能力,以期对猪血资源高值化利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

碱性蛋白酶:酶活 ≥ 2.4 U/g,合肥博美生物科技有限公司;

猪血:合肥万润食品有限公司;

盐酸、硝酸、高氯酸、硫酸、氢氧化钠、氯化亚铁、硫酸铁铵、硼酸钾、三硝基苯磺酸等:分析纯,国药集团化学试剂公司。

1.1.2 仪器与设备

双光束紫外可见分光光度计:1900PC 型,上海谱元仪器有限公司;

pH 计:PHS-3C 型,上海仪电科学仪器有限公司;

冷冻干燥机:FD-1CE 型,北京德天佑科技发展有限公司;

原子吸收光谱仪:iCE 3500 型,美国赛默飞世尔公司;

酶标分析仪:HR801 型,华科瑞科技有限公司;

全自动凯氏定氮仪:L-8900 型,丹麦福斯分析仪器有限公司;

电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-AES):iCAP 7400 型,赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 血球粉加工流程

猪血 $\rightarrow$ 离心分离(6 000 r/min, -4 $^{\circ}\text{C}$, 15 min) $\rightarrow$ 血球液 $\rightarrow$ 超滤(压力 0.15 MPa, 温度 45 $^{\circ}\text{C}$) $\rightarrow$ 喷雾干燥(进风温度 150 $^{\circ}\text{C}$, 排风温度 105 $^{\circ}\text{C}$) $\rightarrow$ 血球粉

1.2.2 血球蛋白粉酶解工艺 取规定量血球粉于规定体积去离子水中,溶解,调节 pH 值,加入规定比例碱性蛋白酶后,置于恒温水浴摇床进行规定条件的酶解反应。反应结束后,水解物于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭酶 3~5 min。冷却至室温后,血球酶解液在 -4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 条件下离心 15 min,过滤,取上清液,随后真空冷冻干燥(-55 $^{\circ}\text{C}$,

48 h),制备血球蛋白肽。

1.2.3 基础理化检测

(1) 脂肪含量:按 GB 5009.6—2016 的索氏抽提法执行。

(2) 水分含量:按 GB 5009.3—2010 的直接干燥法执行。

(3) 蛋白质含量:按 GB 5009.5—2016 的凯氏定氮法执行。

1.2.4 氨基酸组成分析 取 0.1 g 样品于水解管中,加入 10 mL 的 6 mol/L 盐酸溶液,充氮气排净管中空气。置于 110 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱反应 22 h,再用超纯水将溶液定容至 50 mL。取其反应液 1 mL 于烧杯中,真空干燥 24 h,加入 3 mL 0.2 mol/L 的色谱纯 HCl 溶液,混匀后取 1 mL 经 0.22 μm 滤膜过滤,用氨基酸自动分析仪测定组分。

1.2.5 水解度(DH)测定 采用三硝基苯磺酸法(TNBS 法)^[12]。称取一定量样品,用去离子水稀释 4 倍,离心取 10 μL 上清液和 100 μL 硼酸钾(1 mol/L pH 9.2)加入 96 孔酶标板中,之后再加入 40 μL TNBS (1.2 g/L),于 37.1 $^{\circ}\text{C}$ 培育 1 h。采用酶标仪(405 nm)测量吸光值。

1.2.6 单因素试验

(1) pH 值:水解时间 4 h、水解温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、底物添加量 8%、酶与底物比($m_{\text{酶}} : m_{\text{底物}}$)1 : 250,考察 pH 值(7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0)对猪血球蛋白水解物水解效果的影响。

(2) 底物添加量:水解时间 4 h、水解温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、酶与底物比($m_{\text{酶}} : m_{\text{底物}}$)1 : 250、pH 值 9,考察底物添加量(4%, 6%, 8%, 10%, 12%)对水解效果的影响。

(3) 水解温度:水解时间 4 h、底物添加量 8%、酶与底物比($m_{\text{酶}} : m_{\text{底物}}$)1 : 250、pH 值 9,考察水解温度(40, 45, 50, 55, 60 $^{\circ}\text{C}$)对水解效果的影响。

(4) 酶添加量:水解时间 4 h、水解温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、底物添加量 8%、pH 值 9,考察碱性蛋白酶与底物比($m_{\text{酶}} : m_{\text{底物}}$)(1 : 500, 1 : 250, 1 : 167, 1 : 125, 1 : 100)对水解效果的影响。

(5) 水解时间:水解温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、底物添加量 8%、酶与底物比($m_{\text{酶}} : m_{\text{底物}}$)1 : 250、pH 值 9,考察水解时间(2, 4, 6, 8, 10 h)对水解效果的影响。

1.2.7 响应面试验 依据 Box-Behnken 中心组合试验设计和单因素试验结果,选取显著影响蛋白水解度的因素(水解时间、pH 和温度)进行优化。

1.2.8 ICP-AES 检测螯合活性 改进 Wang 等^[13]的方法制备肽—金属螯合物。向 5 mL 蛋白质水解物(20 mg/mL)中添加 1.0 mL ZnCl_2 (50 mg/mL)或 FeCl_2 (50 mg/mL)或 CuCl_2 (50 mg/mL)无机盐溶液,用 0.5 mol/L NaOH 和 0.5 mol/L HCl 调节 pH 值至 6.0。 30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 45 min 后在 $8\,000 \times g$ 下离心 15 min,去除上

清液,获得沉淀物。针对沉淀物,采用 80%乙醇溶液复溶,漩涡混合后,8 000×g 离心,取沉淀,反复操作3次,制得金属螯合物。空白组以 1 mL 蒸馏水代替 ZnCl₂或 FeCl₂或 CuCl₂溶液。GSH(20 mg/mL)和 EDTA(5 mg/mL)作为阳性对照组。

参照 Chope 等^[14]的方法,采用 ICP-AES 检测金属螯合物中铁、铜和锌的含量。分析条件:传动功率 1 300 W;冷却气体流速 15 L/min;辅助气体流速 0.2 L/min;载气流速 0.8 L/min;注射速度 1.5 mL/min;波长 206.20 nm;观察方法为轴位。

螯合率按式(1)计算:

$$R = [(C_{\text{样品}} - C_{\text{空白}}) / (C_{\text{总}} - C_{\text{空白}})] \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R——螯合率,%;

C_{样品}、C_{空白}、C_总——分别是肽—金属螯合物、蛋白水解物、混合溶液(无机盐和蛋白水解物)的金属离子含量,μg/mL。

1.2.9 统计分析方法 采用 SPSS 16.0 的 one-way (ANOVA)进行方差分析,试验数据取 3 个平行试验的平均值。采用 Design Expert 8.0 进行响应面工艺设计。

2 结果与分析

2.1 基本营养指标

对猪血及血球蛋白粉的基本营养指标进行分析比较,如表 1 所示。猪血水分含量为 95.06%,脂肪含量较低。经分离后制备出的血球蛋白粉水分含量为 7.34%,蛋白含量为 91.60%。有报道^[15]指出,猪血球蛋白具有优异的营养特征。团队前期研究^[10-11]已经证明猪血和猪血浆中蛋白质是金属螯合肽的优异前体。因此,优异的猪血球蛋白可用于后续金属螯合肽的制备研究。

2.2 氨基酸组成分析

对猪血粉和血球蛋白粉的氨基酸组成及含量进行分析比较,结果见表 2。两种蛋白粉的酸解产物中均检测出 16 种氨基酸,色氨酸受到破坏,未检出。猪血和血球蛋白中均检出 7 种必需氨基酸,其中亮氨酸、赖氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸含量丰富。这与赵治国等^[16]报道的血球蛋白氨基酸组成特征类似。

2.3 单因素试验

2.3.1 pH 值 由图 1 可知,水解度指标值随 pH 值的增大呈先增大后减小的趋势,与薛照辉等^[17]报道菜籽蛋白

表 2 猪血粉和猪血球蛋白粉的氨基酸组成分析[†]

Table 2 Amino acid composition analysis of porcine blood powder and porcine hemoglobin powder (n=3) g/100 g

氨基酸种类	猪血粉	血球蛋白粉
天冬氨酸	12.31±0.02	12.63±0.02
苏氨酸*	3.72±0.02	3.51±0.02
丝氨酸	5.11±0.03	5.00±0.01
谷氨酸	10.20±0.02	9.71±0.03
甘氨酸	4.01±0.01	4.19±0.00
丙氨酸	7.90±0.01	8.07±0.02
半胱氨酸	1.17±0.00	0.89±0.01
缬氨酸*	8.12±0.02	8.17±0.01
蛋氨酸*	0.89±0.00	0.88±0.01
异亮氨酸*	0.72±0.00	0.47±0.00
亮氨酸*	13.74±0.02	14.05±0.02
酪氨酸	2.72±0.02	2.53±0.01
苯丙氨酸*	7.11±0.02	7.23±0.03
赖氨酸*	9.06±0.03	9.08±0.01
组氨酸	7.38±0.01	7.77±0.02
精氨酸	4.47±0.01	4.37±0.00
必需氨基酸	43.36±0.04	43.39±0.03

† * 表示必需氨基酸。

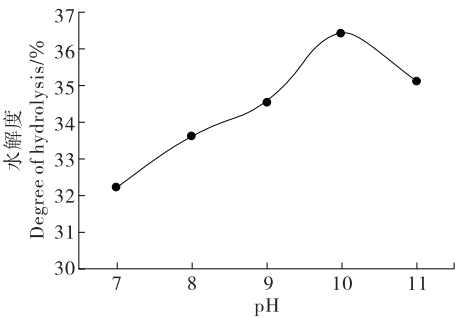


图 1 pH 值对蛋白水解度的影响

Figure 1 Influence of pH values on the degree of proteolysis

酶解有关规律的变化趋势相似。当反应体系 pH 值>10 时,蛋白酶在强碱性条件下空间构象发生改变,降低蛋白酶对底物的酶解效率,导致水解能力降低^[18]。故最佳 pH 值为 10。

2.3.2 底物浓度 由图 2 可知,当底物添加量为 4%~8%时,水解度指标值随底物浓度的升高而略微增加,但不显著;当达到 8%时,水解度达到最大,与殷俊峰等^[11]研究猪血浆蛋白的水解度与底物浓度之间的关系有着相似的影响。这可能是因为部分酶没有与分离蛋白充分接触以及产物达到一定量时会对反应有抑制作用。因此,底物添加量应控制在 8%左右。

表 1 猪血和血球蛋白粉的基本营养指标

Table 1 Basic nutritional indicators of porcine blood and hemoglobin powder (n=3) %

样品	水分	蛋白质	粗脂肪
猪血	95.06±0.02	4.40±0.02	0.21±0.01
血球蛋白粉	7.34±0.01	91.60±0.03	1.99±0.03

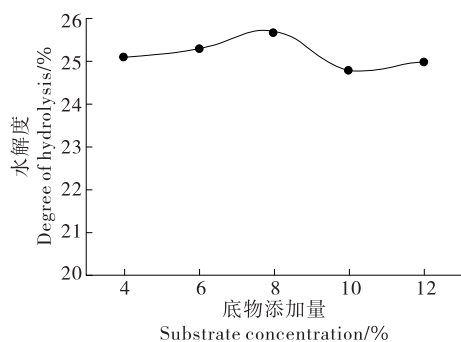


图 2 底物添加量对蛋白水解度的影响

Figure 2 Effects of substrate concentrations on proteolysis degree

2.3.3 水解温度 由图 3 可知,当水解温度 $<50^{\circ}\text{C}$ 时,水解度呈上升趋势;当水解温度 $>50^{\circ}\text{C}$ 时,水解度开始下降。陈树俊等^[19]研究也表明在 50°C 时,酶解核桃粉的水解度达到最大。推测这是由于水解温度在达到蛋白酶的最佳温度之前,升高反应体系的温度将促进蛋白酶活性,而之后升温则会抑制其活性。因此,选择水解温度为 50°C 用于后续工艺优化。

2.3.4 酶添加量 由图 4 可知,水解度在酶与底物比($m_{\text{酶}}:m_{\text{底物}}$)为 $1:500\sim 1:100$ 内添加量呈上升趋势而后缓慢下降。这可能与酶本身也是一种蛋白质,当酶与底物比过大时对酶解过程造成干扰有关。因此,酶与底物比($m_{\text{酶}}:m_{\text{底物}}$)可选择 $1:250$ 。

2.3.5 水解时间 由图 5 可知,水解度呈先快速增加后缓慢增大的趋势,与黄艳燕等^[20]报道水解大米蛋白的酶解时间与水解度的变化趋势相似。这可能是因为随着产物浓度的增加一定程度上抑制了反应的进行。考虑到经济及生产效率,最终选择水解时间为 6 h 用于后续工艺优化。

通过上述 5 个酶解水解度单因素试验发现:水解温度、水解时间及 pH 值对血球蛋白粉水解度具有显著影响($P<0.05$),蛋白酶与底物比和底物添加量对血球蛋白粉水解度的影响不显著($P>0.05$)。

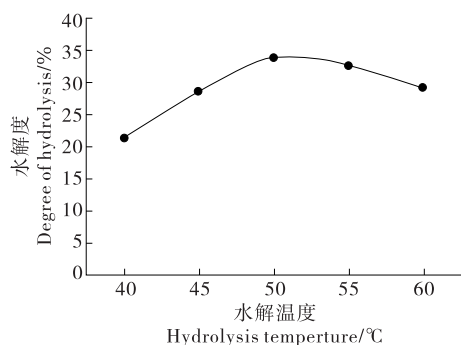


图 3 水解温度对水解度的影响

Figure 3 Effect of hydrolysis temperatures on hydrolysis degree

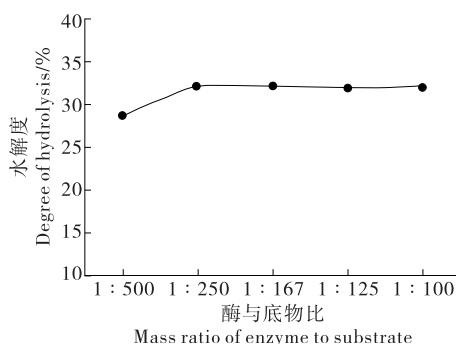


图 4 酶与底物比对蛋白水解度的影响

Figure 4 Effect of mass ratio of enzyme-to substrate on the degree of proteolysis

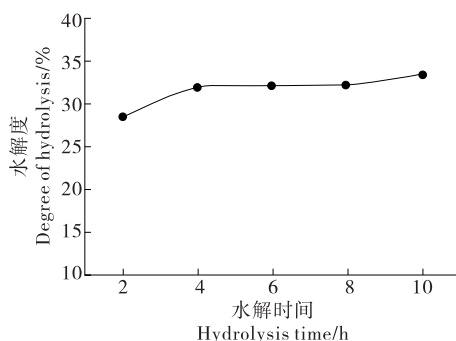


图 5 水解时间对蛋白水解度的影响

Figure 5 Effect of hydrolysis times on hydrolysis degree

由此,在响应面优化中仅对水解度具有显著影响的 3 个因素进行酶解工艺优化。其中固定酶与底物比($m_{\text{酶}}:m_{\text{底物}}$)为 $1:250$,底物添加量为 8% 。

2.4 响应面实验

2.4.1 响应面优化试验与回归模型分析 用 Design-Expert 8.0.5 软件对酶解工艺进行三因素三水平响应面优化设计,试验因素与水平见表 3,结果见表 4。

对试验结果进行二次多元回归模型拟合,分析得到血球蛋白粉酶解工艺的回归方程为:

$$Y = -616.48525 + 56.7025A + 12.512B + 12.561C - 0.0695AB + 0.30875AC - 0.10675BC - 2.59075A^2 - 0.11263B^2 - 0.74144C^2 \quad (2)$$

为验证上述拟合模型的准确性和有效性,对回归方

表 3 响应面实验因素与水平

Table 3 Factor & levels of response surface experiment

水平	A pH	B 水解温度/°C	C 水解时间/h
-1	9	45	4
0	10	50	6
1	11	55	8

表 4 猪血球蛋白制备螯合肽的酶解工艺
响应面分析结果

Table 4 Response surface analysis of enzymatic hydrolysis on chelating peptides from porcine hemoglobin

试验号	A	B	C	水解度/%
1	0	0	0	35.37
2	0	-1	-1	26.40
3	0	1	-1	27.64
4	-1	1	0	26.77
5	0	0	0	35.98
6	-1	0	-1	25.57
7	0	0	0	36.10
8	1	1	0	33.41
9	0	0	0	35.64
10	-1	0	1	29.42
11	1	-1	0	34.94
12	1	0	1	36.38
13	-1	-1	0	26.91
14	0	0	0	36.48
15	1	0	-1	30.06
16	0	-1	1	34.76
17	0	1	1	31.73

程进行方差分析,结果见表 5。

模型 $P<0.000\ 1$ 差异水平极显著,失拟项不显著。由此可知,该模型可合理解释大部分试验变化情况。因此,该模型具有较好的合理性和准确性。

通过上述一次项回归方程,发现影响水解度的顺序为 $A>C>B$,且 A 和 C 项影响呈极显著 ($P<0.000\ 1$);平方项中 A^2 、 B^2 和 C^2 项均呈极显著 ($P<0.000\ 1$);交互项中只有 BC 项影响显著。因此,影响水解度大小因素顺序: pH 值 $>$ 水解时间 $>$ 水解温度。

2.4.2 响应面图分析 由图 6 可知,当水解温度为 $50\ ^\circ\text{C}$, pH 值在 $9.0\sim 10.0$ 范围内增加时,蛋白水解度快速上升, pH 值在 $10.0\sim 11.0$ 范围内增加时,水解度缓慢下降; pH 值为 10 时,水解度随水解温度的增加先升后降。

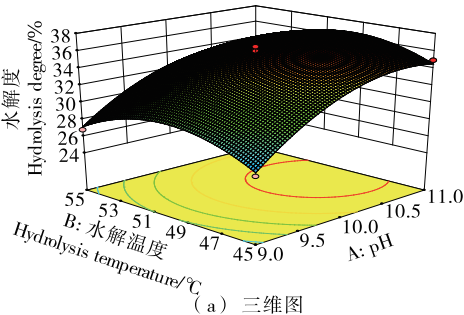


图 6 pH 与水解温度相互作用影响的三维图和等高线图

Figure 6 The three-dimensional diagram and contour map of the interaction between pH value and hydrolysis temperature

表 5 响应面回归模型的方差分析[†]

Table 5 Anovariance analysis of response surface regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F	显著性
模型	267.54	9	29.73	77.70	<0.000 1	* *
A	85.28	1	85.28	222.92	<0.000 1	* *
B	1.50	1	1.50	3.91	0.088 5	
C	63.96	1	63.96	167.18	<0.000 1	* *
AB	0.48	1	0.48	1.26	0.298 2	
AC	1.53	1	1.53	3.99	0.086 0	
BC	4.56	1	4.56	11.91	0.010 7	*
A ²	28.26	1	28.26	73.87	<0.000 1	* *
B ²	33.38	1	33.38	87.26	<0.000 1	* *
C ²	37.03	1	37.03	96.81	<0.000 1	* *
残差	2.68	7	0.38			
失拟项	1.95	3	0.65	3.56	0.126 0	
纯误差	0.73	4	0.18			
总和	270.22	16				

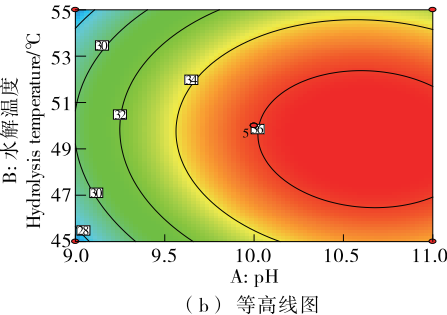
[†] * * 表示差异极显著; * 表示差异显著。

由图 7 可知,当水解时间为 $6\ \text{h}$,水解温度在 $45\sim 50\ ^\circ\text{C}$ 范围内增加时,蛋白水解度呈上升趋势,水解温度在 $50\sim 55\ ^\circ\text{C}$ 范围内增加时,水解度有下降趋势;水解温度为 $50\ ^\circ\text{C}$ 时,水解度随水解时间的增加先升后降。

由图 8 可知,当水解时间为 $6\ \text{h}$, pH 值在 $9.0\sim 10.0$ 范围内增加时,蛋白水解度快速上升, pH 值在 $10.0\sim 11.0$ 范围内增加时,水解度缓慢下降;当 pH 值为 10 时,水解度随水解时间的增加先上升后下降。

2.4.3 响应面试验最优工艺参数 由软件程序优化得到最佳工艺参数为 pH 值 10.69 、水解温度 $48.50\ ^\circ\text{C}$ 、水解时间 $6.76\ \text{h}$ 。在此工艺条件下,猪血球蛋白粉的酶解水解度的预测值为 37.81% 。

按最佳酶解工艺设计 3 次平行实验,取试验数据结果的平均值,获得实测酶解水解度为 37.83% ,较预测值高 0.02% 。相对误差绝对值的平均值小于 10% ,表明响应面法优化的酶解工艺结果是准确可靠的。



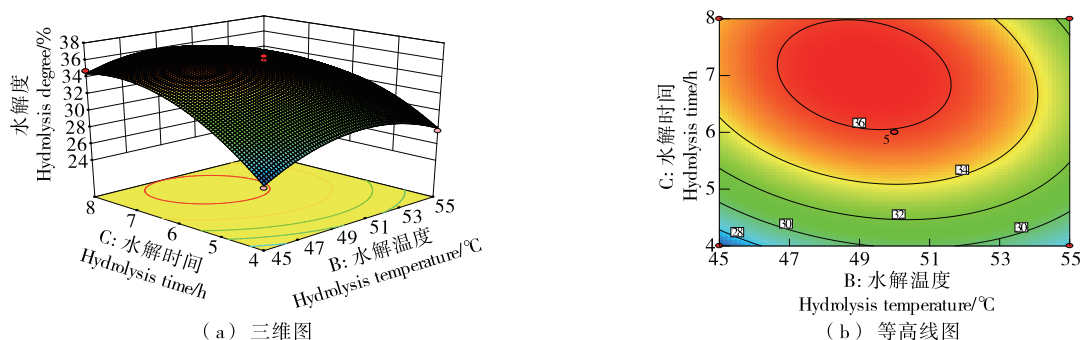


图 7 水解温度与水解时间相互作用影响的三维图和等高线图

Figure 7 The three-dimensional diagram and contour map of the interaction between hydrolysis temperature and hydrolysis time

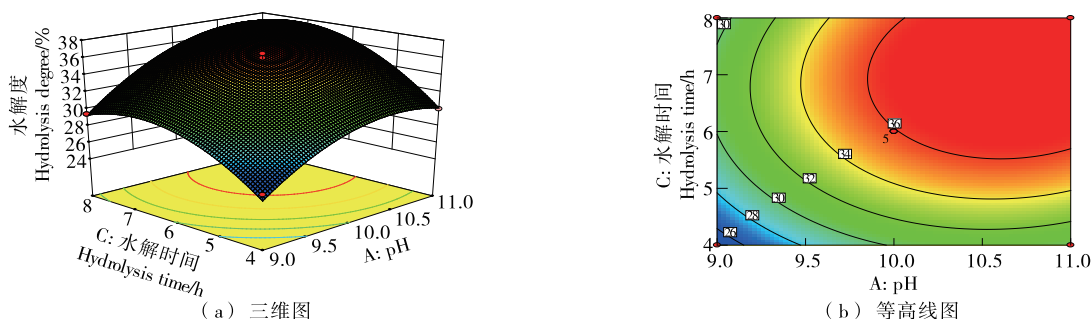


图 8 pH 与水解时间相互作用影响的三维图和等高线图

Figure 8 The three-dimensional diagram and contour map of the interaction between pH and hydrolysis temperature

2.5 猪血球蛋白肽金属螯合能力

将制备的酶解产物分别与 FeCl_2 、 ZnCl_2 和 CuSO_4 溶液进行螯合,得到含有不同金属元素的螯合物,采用 ICP-AES 检测铁、铜和锌的含量,扣除空白,计算其金属螯合能力的强弱。以 GSH 和 EDTA 制备的金属螯合物为阳性对照^[13,21],进行螯合产物的活性比对。由表 6 可知,猪血球蛋白肽金属螯合物的铁、铜、锌螯合能力分别达到 EDTA 的 38.45%,12.13%,50.78%,分别达到 GSH 螯合能力的 46.55%,14.12%,62.23%。

3 结论

采用碱性蛋白酶水解猪血球液中的血球蛋白制备水解物,并评价其金属螯合潜力。在单因素试验中发现,水解温度、水解时间和 pH 对蛋白水解具有明显影响,底物添加量和酶与底物比影响不显著。选择底物添加量为 8%、酶与底物比($m_{\text{酶}}:m_{\text{底物}}$)为 1:250 为固定条件,通

过响应面试验优化血球蛋白酶解工艺,得到最佳工艺条件为 pH 10.69,水解温度 48.50 °C,水解时间 6.76 h。在该条件下,蛋白水解度的预测值为 37.81%,实测值为 37.83%。猪血球蛋白肽具有对铁、铜和锌离子的螯合能力,具有制备第 4 代微量元素补充剂的潜力。在后续试验中还需对金属螯合物的结构性质进行表征研究。

参考文献

- [1] 钟国清. 第三代微量元素添加剂的研究进展[J]. 饲料工业, 1996(2): 23-26.
- [2] 方细娟,曾庆祝,战宇,等. 多肽—金属元素配合物的研究进展及发展前景[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 413-416.
- [3] 祁文磊,冯燕英,许宙,等. 米渣蛋白质酶解条件优化及对镉含量的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 134-139, 236.
- [4] 卢素珍,涂宗财,王辉,等. 二步酶解法制备鱼鳞明胶抗氧化肽及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 160-166.
- [5] 原洪,柴丽琴,权俐,等. 酶法制备花椒籽蛋白铁结合肽的工艺优化[J]. 食品与机械, 2017, 33(10): 163-168, 173.
- [6] 王常麟,王升光,刘晓美,等. 蚌肉肽—锌螯合物制备工艺及其保肝作用研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 103-107.
- [7] 南荟喆. 我国生猪保险专题调查报告[D]. 石家庄: 河北经贸大学, 2018: 1-5.

表 6 猪血球蛋白肽金属螯合物的铁、铜、锌含量[†]Table 6 The iron, copper, zinc content of pig blood hemoglobin protease hydrolysates ($n=3$) $\mu\text{g/mL}$

样品	铁含量	铜含量	锌含量
肽—金属螯合物	343.8±1.5	11.34±1.02	4.53±0.72
GSH—金属螯合物	738.6±1.4	80.32±0.83	7.28±0.86
EDTA—金属螯合物	894.2±2.0	93.49±1.52	8.92±1.07

[†] 含量为扣除空白后的值。

(下转第 201 页)

3 结论

以干芥菜作为原料,从肠膜明串珠菌、植物乳杆菌和戊糖片球菌3株乳酸菌种中筛选发酵剂,分析了3种菌的发酵特性。结果表明:3株菌均可作为干芥菜的发酵菌株,3种菌株混合接种发酵的干芥菜产品总酸、氨基酸态氮、挥发酯含量和感官评分最高,亚硝酸盐含量最低。其中肠膜明串珠菌:植物乳杆菌:戊糖片球菌=2:3:2时,发酵干芥菜的总酸含量为1.07%,氨基酸态氮含量为0.16%,挥发酯含量为2.48 g/kg,感官评分为91.0,其品质较高。研究探讨了以干芥菜为原料生产发酵芥菜的可能性,通过人工接种乳酸菌提升产品品质,缩短发酵周期。但使用的芥菜原料和菌种种类有限,下一步将研究不同原料品种和不同菌种对产品品质的影响、发酵成品杀菌方式的优化等。

参考文献

- [1] 张德纯. 叶用芥菜[J]. 中国蔬菜, 2014(9): 64.
- [2] 薛娜. 发酵叶用芥菜新产品研制[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016: 1.
- [3] 范永红, 沈进娟, 董代文. 芥菜类蔬菜产业发展现状及研究前景思考[J]. 农学学报, 2016, 6(2): 65-71.
- [4] 徐俐, 胡伯凯, 吴康云, 等. 八种高盐腌制芥菜挥发性风味物质的对比分析[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 10-14.
- [5] 曾希珂, 罗凤莲, 张喻, 等. 发酵辣椒低盐化研究进展及展望[J]. 中国调味品, 2017, 42(9): 153-156.
- [6] 刘大群, 华颖. 基于电子鼻与 SPME-GC-MS 法分析不同脱水方式下萧山萝卜干中的挥发性风味物质[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 279-284.
- [7] 张国华, 何国庆. 传统发酵食品中乳酸菌多样性及其功能特

性[J]. 中国食品学报, 2013, 13(9): 174-181.

- [8] 吴丽娜, 谢小本, 刘东红, 等. 腌制蔬菜微生物的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2018, 24(12): 18-22.
- [9] 敖晓琳, 张小平, 史令, 等. 四川泡菜中两株优良乳酸菌的鉴定及不同发酵条件对其发酵泡菜品质的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 152-156.
- [10] 云琳, 毛丙永, 崔树茂, 等. 不同发酵方式对萝卜泡菜理化特性和风味的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.023677.
- [11] 唐小曼, 唐垚, 张其圣, 等. 传统发酵蔬菜中生物胺的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(15): 345-348, 355.
- [12] 王一淇. 芥菜发酵过程中菌相变化规律及发酵剂的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014: 16-22.
- [13] 洪冰. 大头菜发酵工艺及其品质变化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2016: 19.
- [14] 王巧. 复合菌预处理秸秆产沼气试验研究[D]. 西安: 西安工程大学, 2013: 25.
- [15] 大连轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2014: 118.
- [16] 胡楠, 雷鸣, 王远一飞, 等. 传统发酵蓝莓饮料中乳酸菌的分离鉴定及筛选[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(23): 205-211.
- [17] 卿煜维, 杨剑, 赵玲艳, 等. 湖南剁辣椒降解亚硝酸盐乳酸菌筛选鉴定及发酵特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(1): 69-74.
- [18] 朴泓洁, 黄存辉, 金清. 肠膜明串珠菌发酵对四川泡菜品质的影响[J]. 食品科技, 2018, 43(8): 31-35.
- [19] 刘宗敏, 谭兴和, 周红丽, 等. 植物乳杆菌发酵萝卜干品质变化分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 198-202.
- [20] 卿泉. 腌制条件对干芥菜发酵品质的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019: 15.

(上接第 182 页)

- [8] 杨锡洪, 王维民, 崔波, 等. 猪血综合利用技术[J]. 山东食品科技, 2000(6): 5.
- [9] 杨葆春, 靳义超, 李全, 等. 动物血液资源的开发利用研究进展[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2011, 41(5): 44-46.
- [10] 黄晶晶, 张福生, 鄢嫣, 等. 响应面法优化猪血复合微量元素补铁剂螯合工艺[J]. 肉类研究, 2018, 32(12): 24-30.
- [11] 殷俊峰, 张福生, 朱峰, 等. 响应面法优化猪血浆蛋白制备铁螯合肽的酶解工艺[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(23): 84-88.
- [12] XIE Ning-ning, HUANG Jing-jing, LI Bo, et al. Affinity purification and characterisation of zinc chelating peptides from rapeseed protein hydrolysates: Possible contribution of characteristic amino acid residues [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 210-217.
- [13] WANG Chan, LI Bo, AO Jing. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn²⁺ and LC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2012, 134(2): 1 231-1 238.
- [14] CHOPE G A, TERRY L A. Use of canonical variate analy-

sis to differentiate onion cultivars by mineral content as measured by ICP-AES[J]. Food Chemistry, 2009, 115(3): 1 108-1 113.

- [15] 胡晓艳, 王春维. 酶解血球蛋白粉的开发及应用研究进展[J]. 兽药与饲料添加剂, 2008(1): 22-24.
- [16] 赵治国, 吴桃, 青格勒, 等. 饲料中血球蛋白粉替代鱼粉对金鲫鱼生长和饲料利用的影响[J]. 畜牧与饲料科学, 2017, 38(10): 47-49.
- [17] 薛照辉, 吴谋成, 尹经章. 复合酶水解菜籽清蛋白的研究[J]. 中国粮油学报, 2004(3): 57-61.
- [18] JONES S K, REES R M, SKIBA U M, et al. Greenhouse gas emissions from a managed grassland [J]. Global and Planetary Change, 2005, 47(2/3/4): 201-211.
- [19] 陈树俊, 李乐, 石玥, 等. 响应面法优化酶解制备核桃多肽工艺[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 142-149, 158.
- [20] 黄艳燕, 王升, 冯涛, 等. 大米蛋白水解条件的响应面法优化[J]. 广西科学, 2020, 27(2): 175-181, 194.
- [21] 汪婵, 陈敏, 李博. 芝麻蛋白制备金属螯合肽的酶解工艺研究[J]. 食品科技, 2011, 36(9): 184-189.