

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2023.81221

# 酶解—磷酸化协同改性猪血红蛋白制备 工艺优化及特性分析

苏克楠<sup>1,2,3,4</sup> 刘丽莉<sup>1,2,3,4</sup> 程伟伟<sup>1,2,3,4</sup> 丁 玥<sup>1,2,3,4</sup> 徐宝成<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 食品加工与安全国家级教学示范中心, 河南 洛阳 471023; 3. 河南省食品加工与质量安全控制河南省国际联合实验室, 河南 洛阳 471023; 4. 食品微生物河南省工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023)

**摘要:** [目的] 为高值化利用猪血, 提升猪血红蛋白(hemoglobin pig, Hb)的应用范围。[方法] 对Hb进行了酶解—磷酸化协同改性, 并探索最佳制备条件及特性变化。采用响应面法确定最优参数, 研究协同改性对猪血红蛋白(enzymatic hydrolysis-phosphorylation of porcine hemoglobin, HP-Hb)的影响。[结果] 磷酸化的最优参数为磷酸盐添加量 10 g/100 mL、pH 9、猪血红蛋白肽(pig hemoglobin peptide, H-Hb)添加量 8 g/100 mL、反应时间 2.1 h。与Hb和H-Hb相比, HP-Hb的乳化性能和抗氧化性显著提升, 电泳结果表明, 相对分子质量并无明显变化。结构分析表明磷酸根大部分接入在N原子上; 二级结构的变化, 增强了HP-Hb的结构稳定性; HP-Hb的热稳定性增强, 而其微观结构更加松散。[结论] 酶解—磷酸化协同改性处理明显改善了猪血红蛋白的乳化性能、抗氧化性能和热稳定性, 说明协同改性是一种较为可行的改善蛋白质的方法。

**关键词:** 协同改性; 酶解; 猪血红蛋白; 磷酸化; 结构特性

## Optimization of preparation process and characteristics analysis of porcine hemoglobin modified by enzymatic hydrolysis-phosphorylation

SU Kenan<sup>1,2,3,4</sup> LIU Lili<sup>1,2,3,4</sup> CHENG Weiwei<sup>1,2,3,4</sup> DING Yue<sup>1,2,3,4</sup> XU Baocheng<sup>1,2,3,4</sup>

(1. School of Food and Biotechnology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. National Teaching Demonstration Center for Food Processing and Safety, Luoyang, Henan 471023, China; 3. Henan International Joint Laboratory of Food Processing and Quality Safety Control, Luoyang, Henan 471023, China; 4. Henan Engineering Technology Research Center for Food Microbiology, Luoyang, Henan 471023, China)

**Abstract:** [Objective] This study aimed to make high-value use of pig blood and improve the application range of pig hemoglobin (Hb). [Methods] Hb was modified by enzymolysis and phosphorylation, and its optimum preparation conditions and characteristics were explored. The optimal parameters were determined by response surface test to study the effect of enzymatic hydrolysis-phosphorylation of porcine hemoglobin (HP-Hb). [Results] The optimal parameters for phosphorylation were 10 g/100 mL phosphate addition, pH 9, 8 g/100 mL pig hemoglobin peptide (pig hemoglobin peptide, H-Hb) addition, and a reaction time of 2.1 hours. Compared with Hb and H-Hb, HP-Hb showed significantly improved emulsification properties and antioxidant activity. Electrophoresis results indicated no significant change in molecular weight. Structural analysis revealed that the phosphate groups were mostly attached to the N atoms. The change of secondary structure of HP-Hb enhanced its structural stability. [Conclusion] Enzymolysis phosphorylation co-modification significantly improved the emulsification property, antioxidant property and thermal stability of porcine hemoglobin, indicating that co-modification is a feasible method to improve protein.

**Keywords:** synergistic modification; enzymatic modification; porcine hemoglobin; phosphorylation modification; structural characteristics

**基金项目:** 河南省科技攻关专项(编号:242102110092); 河南省重大科技攻关项目(编号:221100110500); 洛阳市科技攻关项目—公益项目(编号:2101021A)

**通信作者:** 刘丽莉(1974—), 女, 河南科技大学教授, 博士。E-mail: yangliuyilang@126.com

**收稿日期:** 2023-12-08 **改回日期:** 2024-06-05

猪血作为畜产品屠宰加工处理中的主要副产物之一<sup>[1]</sup>,是优质的蛋白质来源,其主要成分为猪血红蛋白(hemoglobin pig, Hb)。猪血红蛋白可以赋予和提升食品在制备、加工和贮藏过程中的品质,且与乳类、豆类和大麦蛋白相比不具有致敏性,常被应用于食品加工领域,但由于其稳定性差和有异味等缺点,限制了其在工业上的应用及发展<sup>[2]</sup>。

目前针对蛋白质的改性方法主要通过酶解和化学改性。酶解改性具有过程温和,可以改善稳定性和生物活性等优点。武云娇等<sup>[3]</sup>采用不同方式处理小米中的淀粉,发现经微波和酶解复合处理的结构和理化性质更好。陈思蕊等<sup>[4]</sup>选取了5种酶对核桃蛋白进行改性,发现酶解改性可以显著提高核桃蛋白的溶解性和乳化性,制备的乳液稳定性高,油滴显微体积减小且分散更加均匀。李佳笑等<sup>[5]</sup>通过对花生蛋白高压均质—中性蛋白酶酶解处理后,发现显著提高花生蛋白在pH 4.0条件下的溶解度且改性后蛋白在酸性饮料中稳定性良好。化学改性主要采用磷酸化、糖基化、酰基化和硝基化等方法,通过在蛋白质中添加不同的基团来不同程度地改变蛋白质的活性和功能。李娇等<sup>[6]</sup>研究了改性对酒糟中蛋白质的影响,发现磷酸化可以有效提升醇溶蛋白的功能特性和稳定性。刘静媛等<sup>[7]</sup>研究了磷酸化和糖基化对大豆蛋白胃肠道酶解物性质及其肠道细胞跨膜转运的影响,结果表明磷酸化和糖基化改变了大豆蛋白酶解物的性质,提高了消化产物的表面疏水性,降低了大豆蛋白氨基酸的损失。李金华等<sup>[8]</sup>研究了磷酸化改性对乳清分离蛋白营养价值和消化吸收的影响,结果表明磷酸化改性可以有效改善乳清分离蛋白的功能特性,并对蛋白质的营养价值和消化利用无不利影响。但目前对两种改性方法协同处理蛋白质的研究较少,是否会改善蛋白质的功能特性并且同时具有两种改性方法的优点也尚不明确。

研究拟通过响应面法优化酶解—磷酸化协同改性猪血红蛋白(enzymatic hydrolysis-phosphorylation of porcine hemoglobin, HP-Hb)的制备工艺,并对其协同改性前后猪血红蛋白乳化性能、抗氧化性能和结构变化进行研究,以期拓宽猪血红蛋白在食品加工中的应用层面,提高猪血红蛋白附加值,为猪血红蛋白的修饰提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲜猪血:洛阳正大食品公司;  
三聚磷酸钠:分析纯,南京都莱生物技术有限公司;  
氢氧化钾:分析纯,飞净生物科技有限公司;  
磷酸氢二钠、磷酸二氢钾:分析纯,方正试剂厂;  
溴化钾(KBr):分析纯,天津化工研究所;  
碱性蛋白酶(20万U/mL):分析纯,鑫尔瑞生物科技

有限公司;

标准蛋白 Marker: 光谱纯, 赛默飞世尔科技有限公司;

维生素C(Vc):分析纯,卡郎试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

真空冷冻干燥机:X-21型,北京四环起航科技有限公司;

离心机:TDL-5-A型,上海安可科技有限公司;

磁力搅拌器:M1型,浙江艾科仪器设备有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-2600型,日本岛津仪器有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 猪血红蛋白的分离 将新鲜猪血与8%柠檬酸钠溶液混合<sup>[9]</sup>,柠檬酸钠与猪血的终体积比例为1:125,搅拌均匀,置4℃冷藏保存。猪血红蛋白采用盐析法<sup>[10]</sup>进行分离提取。鲜猪血加入抗凝剂后过滤杂质,经5 000 r/min 15 min离心后去除上层血清和白层,取下层沉淀,加入饱和硫酸铵溶液,调节pH,室温下磁力搅拌1 h,冷冻离心10 000 r/min, 20 min,取下层沉淀,使用纯水透析48 h,每4 h更换一次透析液。透析脱盐后, -40℃预冻10 h,冷冻干燥得猪血红蛋白。

#### 1.3.2 酶解—磷酸化协同改性猪血红蛋白的制备方法

酶解—磷酸化协同改性猪血红蛋白的制备主要分为猪血红蛋白肽(pig hemoglobin peptide, H-Hb)的制备和磷酸化程度调整。制备方法参照刘丽莉等<sup>[11]</sup>的方法,并稍作修改。先将Hb配制为5%的溶液,使用稀盐酸调节pH至8.2,碱性蛋白酶添加量为5 500 U/g,在恒温水浴锅中52.5℃水浴加热5 h,反应结束后,将反应物置于90℃的水浴锅中加热5 min,使酶钝化,冷却至室温,4 500 r/min离心10 min,取上清液冷冻干燥,得到H-Hb。

取上述H-Hb溶于0.02 mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液中,配制成1 g/100 mL的蛋白质溶液,调节pH值至8.0,添加9%的STP,在磁力搅拌器上搅拌4 h,得到HP-Hb溶液,透析48 h进行脱盐除酶处理后,冷冻干燥制成粉末备用。

#### 1.3.3 磷酸化改性单因素试验设计

(1) pH: 固定时间2 h,磷酸盐添加量6 g/100 mL,蛋白(蛋白为H-Hb)添加量6 g/100 mL,分别选取pH为7, 8, 9, 10, 11进行试验,确定最佳pH。

(2) 时间: 固定pH为9,磷酸盐添加量6 g/100 mL,蛋白添加量6 g/100 mL,分别选取时间为1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h进行试验,确定最佳时间。

(3) 磷酸盐添加量: 固定时间2 h, pH为9,蛋白添加量6 g/100 mL,分别选取磷酸盐添加量为4, 6, 8, 10, 12 g/100 mL进行试验,确定最佳磷酸盐添加量。

(4) 蛋白添加量:固定时间 2 h, pH 为 9, 磷酸盐添加量 6 g/100 mL, 分别选取蛋白添加量为 4, 6, 8, 10, 12 g/100 mL 进行试验, 确定最佳蛋白添加量。

1.3.4 磷酸化改性响应面设计 在单因素的基础上, 采用 Box-Behnken 试验设计, 确定响应面的四因素三水平, 以蛋白质磷酸化程度为响应值, 对 pH、时间、磷酸盐添加量和蛋白添加量 4 个因素进行优化, 以获取最优磷酸化程度的条件。

1.3.5 蛋白磷酸化程度测定 采用钼蓝比色法<sup>[12]</sup>, 得到的标准曲线为  $Y=2.0153X+0.1754$ ,  $R^2=0.9912$ 。

1.3.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳 选用标准蛋白 Marker 用于 Hb、H-Hb 和 HP-Hb 电泳分析。将 Hb、H-Hb 和 HP-Hb 配制为 2 mg/mL 的溶液, 加入上样缓冲液, 涡旋混匀后, 沸水加热 10 min, 上样量为 10  $\mu$ L。配制 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶。用含有 1% 考马斯亮蓝 R-250、30% 甲醇和 8% 乙酸的溶液进行染色。配制 10% 醋酸和 5% 乙醇的脱色液, 脱色 4 h 后更换脱色液, 持续 12 h 后观察条带。

1.3.7 乳化性能测定 参照 Xue 等<sup>[13]</sup>的方法。按式(1)和式(2)计算乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性(ESI)。

$$E = \frac{2 \times 2.303}{\rho \times (1 - \varphi) \times 10^4} \times A_0 \times 100, \quad (1)$$

$$S = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

$E$ ——乳化活性指数;

$S$ ——乳化稳定性;

$A_0, A_{10}$ ——乳浊液在 0, 10 min 的吸光值;

$\varphi$ ——油相体积分数(油的体积/乳浊液的体积), %;

$\rho$ ——蛋白质质量浓度, g/mL。

1.3.8 DPPH 自由基清除能力 采用 Liu 等<sup>[14]</sup>的方法并稍作修改, 测定了在光保护条件下对 DPPH 自由基的清除活性。将 Hb、H-Hb 和 HP-Hb 溶解在纯化水中, 生成不同质量浓度(0.5~2.5 mg/mL)的样品溶液。结合 200 mL 样品溶液和 200 mL DPPH 溶液(0.2 mmol/L)进行 DPPH 检测。将混合溶液反应 30 min 后, 搅拌 10 s, 在 517 nm 处测量吸光度。按式(3)计算 DPPH 自由基的清除率。

$$D = \left( 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

$D$ ——DPPH 自由基清除率, %;

$A_1$ ——样品的吸光度值;

$A_2$ ——样品的吸光度值(乙醇而非 DPPH);

$A_0$ ——对照(去离子水代替样品溶液)的吸光度值。

1.3.9 ABTS 阳离子自由基清除能力 参照 Untea 等<sup>[15]</sup>的方法。以样品与过硫酸钾混合液作为空白对照。

1.3.10 铁离子还原能力 参照谢欢欢等<sup>[16]</sup>的方法。

1.3.11 羟自由基清除活性测定 参照刘阳等<sup>[17]</sup>的方法。以  $V_c$  作为阳性对照。

1.3.12 傅里叶红外光谱分析 参照刘丽莉等<sup>[11]</sup>的方法。

1.3.13 热稳定性的测定 使用差示扫描量热仪分析热稳定性, 将(5.0 $\pm$ 0.1) mg 的 Hb、H-Hb 和 HP-Hb 粉末放入铝坩埚中。每组样品在氮气气氛中加热, 在 30~200  $^{\circ}$ C 的温度范围内加热, 加热速率为 10  $^{\circ}$ C/min。

1.3.14 数据分析 试验分 3 个重复进行, 结果以平均 $\pm$ 标准差(SD)表示。采用 SPSS 软件进行统计学分析。采用方差分析进行数据分析, 显著水平设为  $P < 0.05$ 。使用 Origin 2021 软件进行相关性分析和数据可视化。

## 2 结果与分析

### 2.1 磷酸化改性单因素试验

从图 1 可以看出, 随着 pH、时间、磷酸盐添加量和蛋白添加量的增加, HP-Hb 的磷酸化程度呈先上升后下降的趋势。

pH 为 7~9 时, 磷酸化程度逐渐升高, 在 pH 为 9 时到达最高, 当 pH 继续升高磷酸化程度开始降低, 原因可能是 pH 过高, 蛋白质的折叠状态和暴露的氨基酸发生改变, 导致磷酸化程度下降, 或是因为 pH 过高蛋白质变性, 结构被破坏, 导致磷酸化程度降低。

反应时间为 1~2 h 时, 磷酸化程度逐渐升高, 在反应时间为 2 h 时到达最高, 再增加反应时间, 磷酸化程度开始降低。原因可能是反应 2 h 磷酸化反应达到饱和, 再延长反应时间磷酸根可能与蛋白产生了相互作用, 导致磷酸化程度降低。

当磷酸盐添加量为 4~10 g/100 mL 时, 磷酸化程度逐渐增大, 在磷酸盐添加量为 10 g/100 mL 时达到最大, 继续增加磷酸盐, 磷酸化程度开始减少。原因可能是磷酸盐添加量升高, 溶液中的磷酸根浓度增加, 溶液电荷发生了变化, 可能会影响磷酸根离子与氨基酸残基的相互作用。而磷酸根的增多也会改变溶液的 pH, 导致蛋白质的活性下降, 甚至变性, 使其结构被破坏, 从而导致了磷酸化程度的降低。

当蛋白添加量为 4~8 g/100 mL 时, 磷酸化程度上升, 当蛋白添加量为 8~12 g/100 mL 时, 磷酸化程度下降。原因可能是溶液中高浓度的蛋白质由于磷酸根的加入产生了聚集, 影响了磷酸根与氨基酸残基的结合, 导致磷酸化程度降低。

### 2.2 磷酸化改性响应面设计

基于单因素试验结果, 进行响应面设计, 以磷酸化程度为指标, 以 pH、时间、磷酸盐添加量和蛋白(H-Hb)添加量为影响因素, 进行响应面设计。试验因素及水平见表 1, 试验结果见表 2。

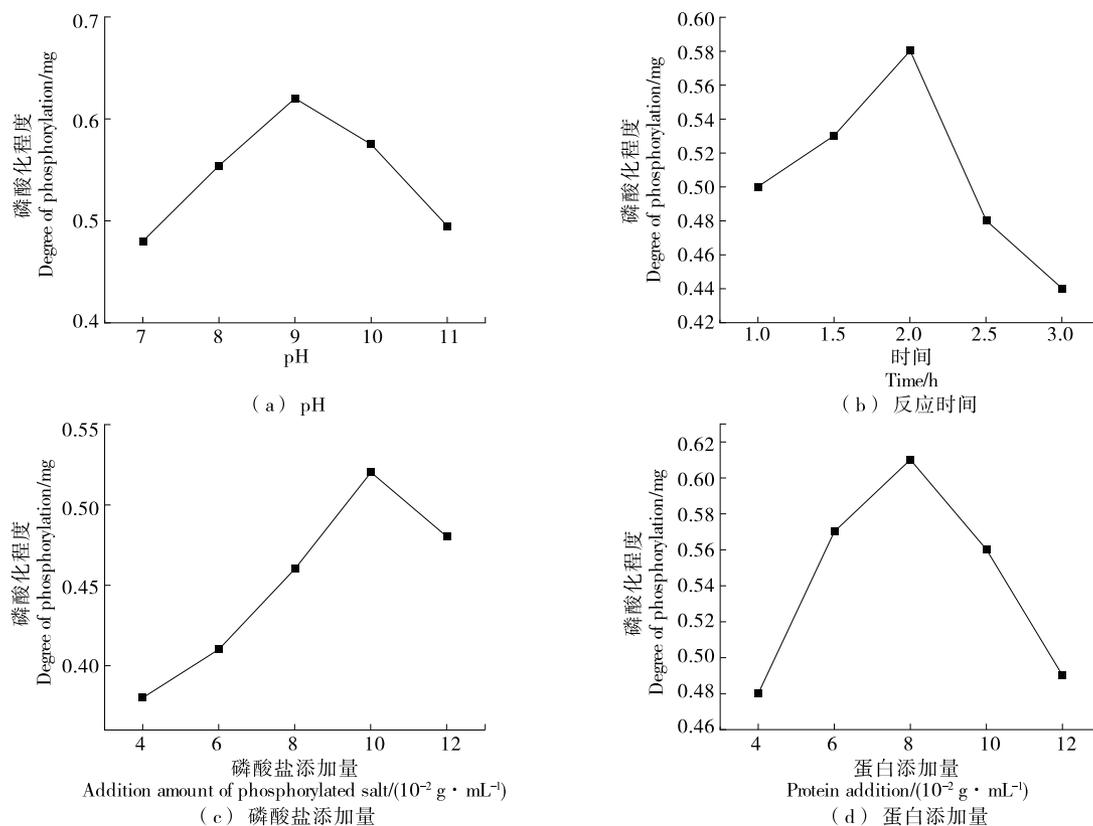


图1 磷酸化程度的单因素试验结果

Figure 1 Single factor test results of phosphorylation degree

表1 响应面设计因素水平表

Table 1 Level table of design factors for response surface experiment

水平	A pH	B 时间/h	C 磷酸盐添加量/ (10 <sup>-2</sup> g · mL <sup>-1</sup> )	D 蛋白添加量/ (10 <sup>-2</sup> g · mL <sup>-1</sup> )
-1	8	1.5	8	6
0	9	2.0	10	8
1	10	2.5	12	10

使用 Design-Expert V8.06.1 软件对试验数据进行多项式回归拟合,得到磷酸化程度与各因素的二次方程模型为:

$$Y = -13.626 62 + 1.548 33A + 0.304 83B + 0.883 42C + 0.599 46D + 0.0744AB - 0.023 875AC - 0.026 625AD - 0.000 6BC + 0.060 25BD - 0.010 875CD - 0.070 875A^2 - 0.334B^2 - 0.027 813C^2 - 0.020 406D^2 \quad (4)$$

由表3可知,模型的  $P$  值  $< 0.000 1$ , 极显著, 而失拟项  $P$  值为 0.257, 不显著, 说明拟合的误差较小, 能反映各个因素与磷酸化程度的联系, 最后得到的预测值比较准确。模型的  $R^2 = 0.996 6$ , 表明试验值与预测值有很好的相关性;  $R_{Adj}^2 = 0.980 4$ , 表明模型可以解释 98.04% 的响应值变化。说明该模型可用于分析和预测酶解—磷酸化协同改

性猪血红蛋白的磷酸化程度。其中, B、C、D、AD 和 AC 对 HP-Hb 的磷酸化程度有显著影响 ( $P < 0.05$ ), A、A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup> 和 D<sup>2</sup> 影响极显著 ( $P < 0.01$ ), 其他影响不显著。

Design-Expert V8.06.1 软件对试验的优化结果为磷酸盐添加量 10.35 g/100 mL、pH 8.8、蛋白添加量 8.35 g/100 mL、反应时间 2.09 h, 该最优条件下的磷酸化程度预测值为 64.69 g/100 mL。采用优化后的参数进行验证实验, 为方便操作, 将参数调整为磷酸盐添加量 10 g/100 mL、pH 9、蛋白添加量 8 g/100 mL、反应时间 2.1 h。经过 3 次平行验证实验后测得的磷酸化程度为  $(64.69 \pm 3.76)\%$ , 与响应面模型的预测值无显著差异, 说明磷酸化程度的参数较为准确。

### 2.3 SDS-PAGE 电泳分析

图2中 M 为标准蛋白 Marker, Hb 在 14 000 左右出现了条带, H-Hb 和 HP-Hb 在 2 000, 2 800, 5 200, 21 000 出现了条带。经酶解改性后, 蛋白质的相对分子质量明显降低, 说明 Hb 经过酶解后变为不同相对分子质量的小肽。经过磷酸化改性后蛋白质的相对分子质量并无明显变化, 因为磷酸根的接入对肽的相对分子质量改变较小, 在电泳条带上较难看出。21 000 的条带可能是没有酶解完全, 蛋白质发生了聚集。

表 2 磷酸化程度响应面设计及结果

Table 2 Response surface design and results of phosphorylation degree

试验号	A	B	C	D	磷酸化程度/mg	试验号	A	B	C	D	磷酸化程度/mg
1	1	1	0	0	0.624	16	-1	1	0	0	0.467
2	0	1	1	0	0.504	17	0	0	-1	-1	0.346
3	0	1	-1	0	0.497	18	0	-1	-1	0	0.646
4	1	-1	0	0	0.465	19	0	0	1	1	0.432
5	0	-1	1	0	0.547	20	0	1	0	-1	0.387
6	0	0	0	0	0.411	21	1	0	0	-1	0.641
7	0	1	0	1	0.366	22	-1	0	1	0	0.405
8	1	0	1	0	0.408	23	1	0	0	1	0.625
9	0	-1	0	-1	0.492	24	-1	0	-1	0	0.378
10	0	0	0	0	0.417	25	-1	0	0	1	0.626
11	1	0	-1	0	0.391	26	-1	0	0	-1	0.623
12	0	0	0	0	0.378	27	0	1	1	0	0.622
13	-1	-1	0	0	0.467	28	0	1	-1	0	0.451
14	0	0	0	0	0.551	29	1	-1	0	0	0.271
15	0	0	1	-1	0.475						

表 3 回归模型磷酸化程度方差分析<sup>†</sup>

Table 3 Variance analysis of phosphorylation degree of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.300 000	14	0.022 000	291.36	<0.000 1	极显著
A	0.009 464	1	0.009 460	127.75	<0.000 1	
B	0.009 690	1	0.009 690	130.80	0.012 5	
C	0.005 334	1	0.005 334	72.00	0.024 5	
D	0.093 000	1	0.093 000	1 256.75	0.030 1	
AB	0.005 476	1	0.005 476	73.92	<0.000 1	极显著
AC	0.010 000	1	0.010 000	137.70	0.047 8	显著
AD	0.011 000	1	0.011 000	153.10	0.042 1	显著
BC	0.001 440	1	0.001 440	1.94	0.185 0	
BD	0.015 000	1	0.015 000	196.00	0.000 2	极显著
CD	0.009 900	1	0.009 900	133.64	0.000 7	极显著
A <sup>2</sup>	0.037 000	1	0.037 000	499.09	<0.000 1	
B <sup>2</sup>	0.044 000	1	0.044 000	599.55	<0.000 1	
C <sup>2</sup>	0.082 000	1	0.082 000	1 113.07	<0.000 1	
D <sup>2</sup>	0.039 000	1	0.039 000	529.26	<0.000 1	
残差	0.001 037	14	0.000 740			
失拟项	0.001 027	10	0.000 102	5.69	0.257 4	不显著
纯误差	0.000 001	4	0.000 025			
总和	0.300 000	28				

<sup>†</sup> R<sup>2</sup>=0.996 6; R<sup>2</sup><sub>Adj</sub>=0.980 4。

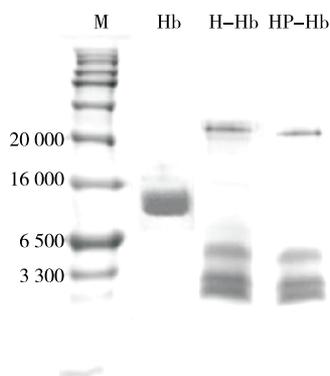


图 2 Hb、H-Hb 和 HP-Hb 的 SDS-PAGE 电泳图

Figure 2 SDS-PAGE electrophoregram of HB, H-Hb and HP-Hb

2.4 酶解—磷酸化协同改性猪血红蛋白的乳化性能

图 3 中显示了 Hb、H-Hb、HP-Hb 的乳化性能。HP-Hb 的 EAI 与 Hb 和 H-Hb 相比升高了 6.31, 12.42 m<sup>2</sup>/g, ESI 升高了 3.04%, 6.37%。原因可能是协同改性导致 Hb 的结构发生了变化, 增强了蛋白质与油水界面的亲和力。并且磷酸化通常会引入负电荷基团到蛋白质分子上, 可以增加蛋白质与水相之间的排斥力, 同时增加蛋白质与油相之间的吸引力, 从而有助于在油水界面形成更稳定的乳化系统。表明协同改性可以有效提高猪血红蛋白的乳化性能, 与刘丽莉等<sup>[11]</sup>的研究结果一致。

2.5 酶解—磷酸化协同改性猪血红蛋白的抗氧化性

由图 4 可以看出, HP-Hb 与 Hb 和 H-Hb 相比, DPPH 自

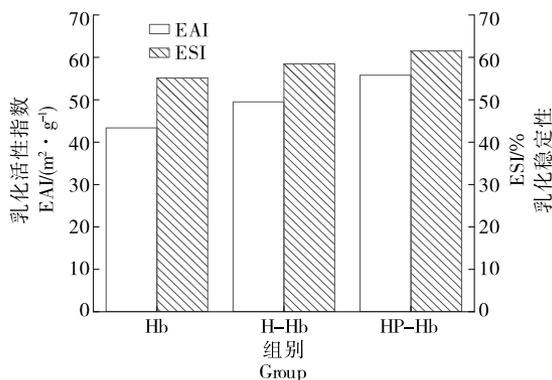


图3 Hb、H-Hb和HP-Hb的乳化活性指数和乳化稳定性  
Figure 3 Emulsifying total activity and emulsifying stability of HB, H-Hb and HP-Hb

由基清除率、羟自由基清除率、ABTS阳离子自由基清除率、铁离子还原能力都得到了显著增强,分别提升了10.67, 12.76, 8.40, 13.58个百分点和7.32, 7.12, 4.67, 9.97个百分点。原因可能是酶解后Hb被酶解为大量小肽,氨基酸残基增多,可结合的自由基增多;磷酸化后磷酸根接入,溶液的电荷状态发生了改变,能够结合更多的自由基。表明协同改性可以有效提升猪血红蛋白的抗氧化能力,与Li等<sup>[18]</sup>的研究结果一致。

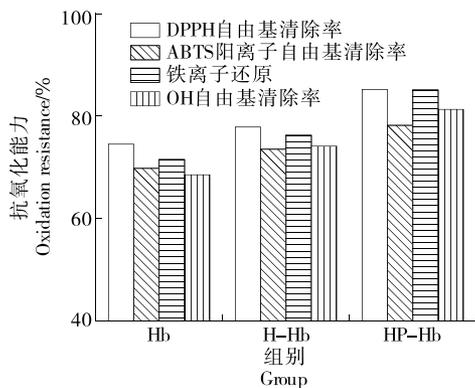


图4 Hb、H-Hb和HP-Hb的抗氧化性图  
Figure 4 Oxidation resistance of HB, H-Hb and HP-Hb

2.6 傅里叶红外光谱分析

FT-IR光谱通常用于表征化学键和官能团<sup>[19]</sup>,它可以分析Hb、H-Hb和HP-Hb的结构变化。HP-Hb在酰胺I带有特征吸收,PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>的红外特征吸收峰在1100 cm<sup>-1</sup>左右,P—N的吸收峰在500 cm<sup>-1</sup><sup>[20]</sup>。由图5可以看出,PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>在950~1100 cm<sup>-1</sup>内有对称伸缩振动,在1000~1200 cm<sup>-1</sup>内有反对称伸缩振动,在500~700 cm<sup>-1</sup>内有弯曲振动。由于酶解导致Hb的肽链打开,PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>与—NH反应,导致了HP-Hb的峰产生红移。也可能是在酰胺III带H-Hb和STP发生了共价键结合。HP-Hb在900, 700 cm<sup>-1</sup>处的吸收峰

与500 cm<sup>-1</sup>处峰的增加有关,原因可能是与三聚磷酸钠反应后,磷酸根增加,负电荷升高,所以吸收峰发生了偏移,透光率也发生了变化,产生了新的吸收峰。

对蛋白质采用不同的处理方法会影响肽链中的氢键,导致蛋白质二级结构的改变,特别是α-螺旋和β-折叠的含量,二级结构含量主要由氢键决定。通过Peakfit Version 4.2分别对图5中1600~1700 cm<sup>-1</sup>处的峰谱图进行去卷积、二阶求导和高斯拟合处理,得到图6。结果表明,HP-Hb的二级结构含量有显著变化。蛋白质中的β-折叠与分子间的氢键形成的相互作用有关。与Hb和H-Hb相比,HP-Hb的β-折叠含量分别增加了11%和8%,β-折叠的形成通常涉及多个氨基酸残基的相互作用,可以使蛋白质结构更为紧凑。说明磷酸根的接入导致蛋白质的电荷分布发生改变。这种改变可能会影响蛋白质内的相互作用,包括氢键、离子键和疏水相互作用。磷酸根的接入会导致H-Hb的结构发生变化,导致无规卷曲的减少。α-螺旋含量通常与蛋白质的稳定性相关,α-螺旋含量的增加可能增强蛋白质的结构稳定性<sup>[21]</sup>。HP-Hb中的α-螺旋含量增加,表明其稳定性增强。

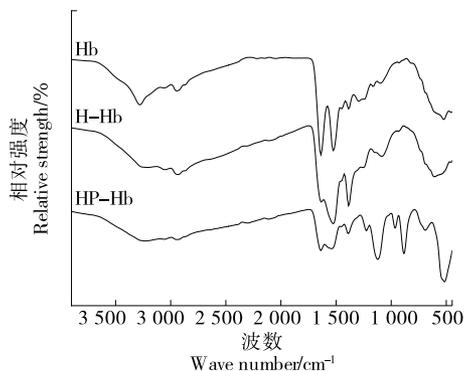


图5 Hb、H-Hb和HP-Hb的FT-IR图  
Figure 5 FT-IR diagrams of HB, H-Hb and HP-Hb

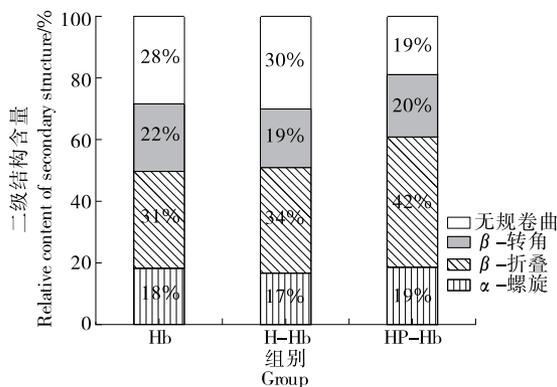


图6 Hb、H-Hb和HP-Hb的二级结构含量分布图  
Figure 6 Distribution of secondary structure content of Hb, H-Hb and HP-Hb

## 2.7 热稳定性分析

由图 7 可知, Hb、H-Hb 和 HP-Hb 的热变性温度为 HP-Hb (86.57 °C) > H-Hb (72.70 °C) > Hb (66.57 °C), 热焓值为 HP-Hb (619.87 J) < H-Hb (381.96 J) < Hb (269.01 J)。原因是温度过高会导致蛋白质变性, 破坏其分子构象。蛋白质的氨基酸组成会影响蛋白质的稳定性。其中疏水性氨基酸与亲水性氨基酸相比, 结构稳定性更强, 不易变性。由于酶解处理 Hb, Hb 的球形蛋白结构打开, 内部疏水氨基酸被释放出来, 同时磷酸化引入电子, 增强了其分子间的离子相互作用, 使得蛋白质变性所需要的热能更多, 蛋白质能够承受的温度更高。所以 HP-Hb 的热稳定性相比 Hb 和 H-Hb 更强。由此说明酶解一磷酸化协同改性提高了猪血红蛋白的热稳定性。

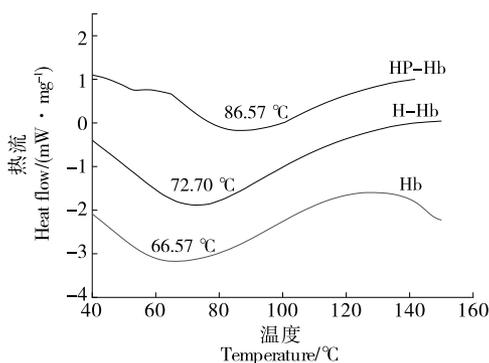


图 7 Hb、H-Hb 和 HP-Hb 的热变性曲线

Figure 7 Thermal denaturation curves of Hb, H-Hb and HP-Hb

## 3 结论

研究采用酶解一磷酸化协同改性猪血红蛋白, 并对其磷酸化工艺进行了优化, 在单因素基础上, 对磷酸化工艺进行响应面优化, 得到的磷酸化最优工艺为磷酸盐添加量 10 g/100 mL、pH 9、蛋白添加量 8 g/100 mL、反应时间 2.1 h。酶解一磷酸化协同改性后猪血红蛋白的乳化活性指数和乳化稳定性得到大幅度提升, 提升了 12.42 m<sup>2</sup>/g 和 6.37%。抗氧化性能分析表明, 与猪血红蛋白相比, 酶解一磷酸化协同改性猪血红蛋白的 DPPH 自由基清除率提升了 10.67%、羟自由基清除率提升了 12.76%, ABTS 阳离子自由基清除率提升了 8.40%, 铁离子还原能力提升了 13.58%。电泳结果显示, 酶解一磷酸化协同改性猪血红蛋白条带主要出现在 2 000, 2 800, 5 200 和 21 000, HP-Hb 和 H-Hb 相比条带无明显变化。红外分析表明, 酶解一磷酸化协同改性猪血红蛋白在 950~1 100, 1 000~1 200, 500~700 cm<sup>-1</sup> 范围内出现特征吸收, 且酶解一磷酸化协同改性猪血红蛋白的峰产生了红移; 二级结构中  $\alpha$ -螺旋含量和  $\beta$ -折叠含量增多, 表明结构稳

定性增强。对其热稳定性进行分析发现协同改性后的热变性温度升高, 热焓值降低, 热稳定性增强。酶解一磷酸化协同改性处理明显改善了猪血红蛋白的乳化性能、抗氧化性能和热稳定性, 是一种有效改善蛋白质特性的改性方法。

## 参考文献

- [1] 邢彩云, 沈玥, 位正鹏, 等. 羧甲基纤维素钠和羟乙基纤维素对冷冻猪血豆腐品质的影响[J]. 肉类研究, 2022, 36(5): 37-41. XING C Y, SHEN Y, WEI Z P, et al. Effect of addition of carboxymethyl cellulose sodium or hydroxyethyl cellulose on the quality of frozen porcine blood curd[J]. Meat Research, 2022, 36(5): 37-41.
- [2] 马晓庆, 刘洋, 孙杨赢, 等. 磷酸化亚硝基猪血红蛋白代替亚硝酸盐部分作用及其对乳化肠品质的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 46-52. MA X Q, LIU Y, SUN Y Y, et al. Effect of phosphorylated nitroso porcine hemoglobin as partial nitrite substitute on the quality of emulsified sausage[J]. Food Science, 2022, 43(4): 46-52.
- [3] 武云娇, 王一飞, 魏明智, 等. 微波复合酶解改性对小米淀粉结构表征及其理化特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(11): 44-51. WU Y J, WANG Y F, WEI M Z, et al. Effect of microwave complex enzymatic digestion on structural and physicochemical properties of millet starch[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association 2023, 38(11): 44-51.
- [4] 陈思蕊, 黄子林, 邢若雨, 等. 低限度酶改性核桃蛋白乳液性质研究[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(3): 33-40. CHEN S R, HUANG Z L, XING R Y, et al. Study on properties of walnut protein emulsion modified by limited enzymatic hydrolysis[J]. Science and Technology of Cereals Oils and Foods, 2023, 31(3): 33-40.
- [5] 李佳笑, 石爱民, 赵志浩, 等. 高压均质一酶解改性提高酸性条件下花生蛋白的溶解性及其稳定性研究[J]. 核农学报, 2021, 35(6): 1 356-1 366. LI J X, SHI A M, ZHAO Z H, et al. Combining high-pressure homogenization and enzymatic hydrolysis to improve the solubility and stability of peanut protein under acidic conditions [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(6): 1 356-1 366.
- [6] 李娇, 梁雅琪, 王景雪, 等. 白酒糟醇溶蛋白的磷酸化改性及功能性质[J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 60-67. LI J, LIANG Y Q, WANG J X, et al. Phosphorylated modification and functional properties of prolamin from Baijiu distiller's grains[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(9): 60-67.
- [7] 刘静媛, 王睿繁, 吕莹, 等. 磷酸化和糖基化对大豆蛋白体外消化性的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 89-99.

- LIU J Y, WANG R C, LU Y, et al. Effects of phosphorylation and glycosylation on the digestibility of soybean protein in vitro [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 89-99.
- [8] 李金华, 李博, 王成涛. 乳清蛋白磷酸化改性对其营养价值和消化吸收的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 19-28.
- LI J H, LI B, WANG C T, et al. The effect of phosphorylation on nutritional value and nutritional quality of whey protein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 19-28.
- [9] 姚伦欢, 郝刚, 唐善虎, 等. 胰蛋白酶对猪血红蛋白酶解脱色条件优化[J]. 肉类研究, 2020, 34(10): 19-25.
- YAO L H, HAO G, TANG S H, et al. Optimization of conditions for decolorization of porcine hemoglobin by trypsin [J]. Meat Research, 2020, 34(10): 19-25.
- [10] 吴雅茹, 陈贵茹, 雷建都, 等. 桑叶蛋白超声提取联合超滤纯化工艺优化及其营养评价[J]. 食品工业科技, 2023, 44(16): 236-245.
- WU Y R, CHEN G R, LEI J D, et al. Optimization of ultrasonic extraction combined with ultrafiltration for purification of mulberry leaf protein and its nutritional evaluation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(16): 236-245.
- [11] 刘丽莉, 李玉, 王焕, 等. 酶解—磷酸化协同改性对卵白蛋白特性与结构的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 17-20, 52.
- LIU L L, LI Y, WANG H, et al. Effect of the synergistic modification of enzymatic hydrolysis and phosphorylation on functional and structural characteristics of ovalbumin[J]. Food & Machinery, 2017, 33(6): 17-20, 52.
- [12] 胡方洋, 陈金玉, 郭晋廷, 等. 豌豆抗性淀粉对磷酸化肌原纤维蛋白基乳液体外消化率及凝胶特性的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(10): 108-117.
- HU F Y, CHEN J Y, GUO J Y, et al. Effects of pea resistant starch on in vitro digestibility and gel properties of phosphorylated myofibrillar protein-based emulsion[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(10): 108-117.
- [13] XUE X H, HE H Y, LIU C J, et al. Effects of zein modifying polar amino acids as surface stabilizers on the emulsification stability of milk cream diacylglycerol[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 165: 113676.
- [14] LIU L L, GUO J F, WANG Z, et al. Effect of interaction between catechin and glycosylated porcine hemoglobin on its antioxidant functional and structural properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 182: 114868.
- [15] UNTEA E A, OANCEA G A, VLAICU A P, et al. Blackcurrant (fruits, pomace, and leaves) phenolic characterization before and after in vitro digestion, free radical scavenger capacity, and antioxidant effects on iron-mediated lipid peroxidation[J]. Foods, 2024, 13(10): 1 514.
- [16] 谢欢欢, 任仙娥, 宋杨凤, 等. 水力空化处理对大豆分离蛋白/儿茶素相互作用及结构功能特性的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(7): 202-210.
- XIE H H, REN X E, SONG Y F, et al. Effect of hydrodynamic cavitation treatment on the interaction between soy protein isolate (SPI) and catechin and structure and functional properties of SPI-catechin conjugates[J]. Food Science, 2024, 45(7): 202-210.
- [17] 刘阳, 彭翠, 吴彦辰, 等. 盐穗木金属硫蛋白HcMT的体外自由基清除活性及抗氧化能力[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(9): 17-26.
- LIU Y, PENG C, WU Y C, et al. Free radical scavenging activity and antioxidant capacity of metallothionein HcMT from *Halostachys caspica* in vitro[J]. China Biotechnology, 2022, 42(9): 17-26.
- [18] LI H Y, LI Z, WANG P W, et al. Evaluation of citrus pectin extraction methods: synergistic enhancement of pectin's antioxidant capacity and gel properties through combined use of organic acids, ultrasonication, and microwaves[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 266 (P1): 131164.
- [19] ASHOKA R, KANJANA T, WORAWIKUNYA K, et al. Image mapping of biological changes and structure-function relationship during rice grain development via Synchrotron FTIR spectroscopy[J]. Food Chemistry Advances, 2023, 2: 100290.
- [20] ÁLVAREZ C, TIWARI K B, RENDUELES M, et al. Use of response surface methodology to describe the effect of time and temperature on the production of decoloured, antioxidant and functional peptides from porcine haemoglobin by sub-critical water hydrolysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 73: 280-289.
- [21] 崔航, 王冀菲, 杨建, 等. 重金属铅对大麦苗粉蛋白质二级结构及氨基酸的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(12): 67-73.
- CUI H, WANG J F, YANG J, et al. Effect of heavy metal lead on protein secondary structure and amino acids of barley seedling powder[J]. Food Science, 2023, 44(12): 67-73.