

芝麻蛋白肽亚铁螯合物的制备工艺优化

胡乔迁, 曹 晖*, 葛林丽, 张 萌, 陈子彤

(扬州大学 旅游烹饪学院, 江苏 扬州 225127)

摘 要: 以芝麻蛋白为原料, 螯合率和螯合物的产品得率为指标, 在单因素实验基础上采用 Box - Behnken 响应面分析法, 研究 V_C 与亚铁盐质量比、肽铁质量比、pH 值、时间、温度、乙醇用量对螯合反应的影响, 从而优化芝麻蛋白肽亚铁螯合物的制备工艺。结果表明: 最佳螯合反应条件为 V_C 与亚铁盐的质量比 0.2:1、肽铁质量比 3:1、pH7.40、时间 17 min、温度 32 °C、乙醇体积倍数为反应液体积的 6 倍。在此条件下, 螯合率为 72.36%, 螯合物产物得率为 44.09%。

关键词: 芝麻蛋白肽; 亚铁螯合; 螯合物; 螯合率

中图分类号: TS 972.111

文献标识码: A

文章编号: 2095 - 8730(2018)03 - 0054 - 06

铁是生物体维持正常生命活动所必需的微量元素, 是细胞色素、血红蛋白以及酶的重要组成部分, 起着运输氧和电子的功能。^[1] 缺铁会导致贫血, 发育不良等多种疾病。^[1] 近年来研究结果表明, 无机酸铁和有机酸铁吸收利用差, 有一定毒副作用。而肽亚铁螯合物无胃肠道刺激、吸收率高, 安全没有不良反应, 是理想的铁补充剂。^[2-4] 目前, 以芝麻蛋白肽与亚铁离子螯合制备肽亚铁螯合物的研究较少。芝麻蛋白中含硫氨基酸丰富, 这些氨基酸具有与金属结合的活性基团。而且我国芝麻资源丰富, 芝麻榨油副产品芝麻粕含蛋白质 40% ~ 46%, 但通常被用作饲料或农业肥料,^[5] 使芝麻蛋白没有得到进一步综合利用。

本研究采用酶法制备芝麻蛋白肽, 与氯化亚铁螯合制备芝麻蛋白肽 - 亚铁螯合物。通过单因素试验和响应面实验, 确定最佳的螯合条件, 筛选制备芝麻蛋白肽亚铁螯合物的最佳工艺条件, 为新型补铁产品的开发利用提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

芝麻蛋白: 实验室自制。碱性蛋白酶(230 U/mg) 购于上海蓝季科技发展有限公司; 抗坏血酸、邻菲罗啉、四水合氯化亚铁、硫酸亚铁、盐酸羟

胺、高锰酸钾、无水乙醇等均为国产分析纯。

S - 3C pH 计: 上海精科有限公司; GT10 - 2 台式高速离心机: 北京北利离心机有限公司; HH - 8 数显恒温水浴锅: 国华电器有限公司; 755S 紫外可见分光光度计: 上海棱光技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芝麻蛋白的酶解

称取一定量的芝麻蛋白配成 2% 的蛋白液 → 调节 pH 至碱性蛋白酶反应最适 pH10 (2 mol/L NaOH 和 HCl 调节) → 按 1 250 U/g 比例添加碱性蛋白酶 → 50 °C 下酶解 3 h → 灭酶 (加热煮沸 10 min) → 离心 (4 000 r/min, 20 min) → 收集上清液 → 冷冻干燥即得芝麻蛋白肽。^[5]

1.2.2 亚铁螯合物的制备

称取一定质量的芝麻蛋白肽配成 30 mg/mL 芝麻蛋白肽溶液 → 加入适量 V_C → 搅拌, 调节 pH 至 5.0 (2 mol/L NaOH 和 HCl 调节) → 按比例加入四水合氯化亚铁 (肽: 铁 = 3:1) → 恒温热水浴中反应 30 min → 加入无水乙醇析出螯合物 → 离心 (10 000 r/min, 15 min), 弃上层清液 → 无水乙醇洗涤沉淀 → 离心 (10 000 r/min, 15 min), 弃上层清液 → 干燥 → 得到芝麻蛋白肽 - 亚铁螯合物。

1.2.3 铁含量测定

采用邻菲罗啉比色法。^[6]

收稿日期: 2018 - 05 - 13 * 通信作者

作者简介: 胡乔迁 (1992 -), 女, 山东济宁人, 扬州大学旅游烹饪学院硕士研究生, 从事营养与食品卫生研究;

曹 晖 (1968 -), 女, 江苏扬州人, 扬州大学旅游烹饪学院副教授, 博士, 从事食品营养与加工研究。

1.2.4 螯合率测定

$$\text{螯合率} = M_1 / M_0 \times 100\%$$

上述公式中 M_1 为螯合物中铁的质量 (mg); M_0 为加入反应体系中铁的总质量 (mg)。

1.2.5 螯合物产品得率的测定

$$\text{产品得率} = W_1 / W_0 \times 100\% \quad [6-7]$$

上述公式中 W_1 为经干燥后的芝麻蛋白肽-亚铁螯合物的总质量 (mg); W_0 为多肽与铁盐的总质量 (mg)。

1.2.6 螯合条件单因素实验

在肽铁质量比3:1、温度40℃、pH5.0、时间30 min、无水乙醇体积倍数为6(无水乙醇是反应结束反应液体积的倍数)的条件下,研究 V_C 与亚铁盐不同质量比(0.10:1.00、0.15:1.00、0.20:1.00、0.25:1.00、0.30:1.00)对螯合反应的影响。

在 V_C 与亚铁盐的质量比0.20:1.00、温度40℃、pH5.0、时间30 min、无水乙醇体积倍数为6的条件下,研究肽铁不同质量比(0.5:1.0、1.0:1.0、2.0:1.0、3.0:1.0、4.0:1.0)对螯合反应的影响。

在 V_C 与亚铁盐的质量比0.20:1.00、肽铁质量比2.0:1.0、温度40℃、时间30 min、无水乙醇体积倍数为6的条件下,研究不同 pH(4、5、6、7、8)对螯合反应的影响。

在 V_C 与亚铁盐的质量比0.20:1.00、肽铁质量比2.0:1.0、温度40℃、pH7、无水乙醇体积倍数为6的条件下,研究反应时间(10、20、30、40、50 min)对螯合反应的影响。

在 V_C 与亚铁盐的质量比0.20:1.00、肽铁质量比2.0:1.0、pH7、时间20 min、无水乙醇的体积倍数为6的条件下,研究不同温度(20、30、40、50、60℃)对螯合反应的影响。

在 V_C 与亚铁盐的质量比0.20:1.00、肽铁质量比2.0:1.0、温度30℃、pH7、时间20 min的条件下,研究不同无水乙醇体积倍数(4、5、6、7、8)对螯合反应的影响。以螯合率和产品得率为评价指标,按上述顺序进行单因素实验,每组实验做3次平行,取平均值。

1.2.7 响应面优化

在单因素实验的基础上,以螯合率和产品得率为响应值进行四因素三水平的响应面实验,^[5]因素水平如表1所示。

1.2.8 数据处理

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对数据进行

分析处理。^[8]

表1 响应面自变量因素编码及水平

因素	水 平		
	-1	0	1
A 肽铁质量比	1:1	1:2	1:3
B pH 值	6	7	8
C 时间(min)	10	20	30
D 温度(℃)	20	30	40

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 V_C 与亚铁盐的质量比对螯合反应的影响

二价铁在水中极易被氧化为 Fe_2O_3 ,需要加入抗氧化剂加以保护。 V_C 加入过少, Fe^{2+} 容易氧化成 Fe^{3+} ,导致螯合物不纯;^[9,10] V_C 加入过多,虽能有效防 Fe^{2+} 的氧化,但反应体系中多余的 V_C 可能会破坏反应体系的酸碱值,螯合率和产品得率略有下降。^[9]因此芝麻蛋白肽-亚铁螯合反应的 V_C 与亚铁盐的质量比应选取0.2:1。

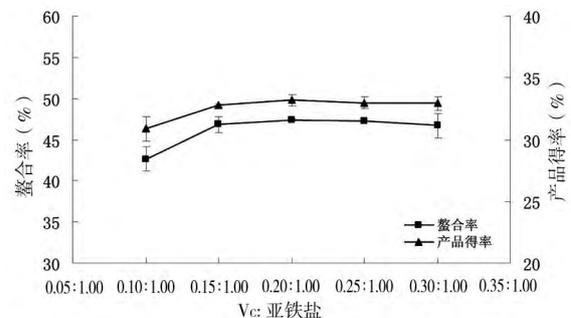


图1 V_C 与亚铁盐质量比对蛋白肽亚铁螯合率及产品得率的影响

2.1.2 肽与亚铁盐的质量比对螯合反应的影响

由图2可知,当肽铁质量比从0.5:1.0到2.0:1.0时,螯合率和产品得率上升,分别为49.87%、25.20%,当肽与亚铁盐质量比超过2.0:1.0时,螯合率和螯合物的产品得率下降。这可能是因为当多肽与氯化亚铁的质量比过少时,形成的螯合物环状结构不稳定;若肽铁质量比过大,部分多肽剩余没有参与反应,使得螯合率和产品得率下降。^[1,10]因此,螯合反应的肽铁质量比例为1.0:1.0~3.0:1.0。

2.1.3 pH 值对螯合反应的影响

由图3可知,随着 pH 值的增大,螯合率和产品得率都是先上升后下降。这是因为在酸性环境

中,溶液中氢离子浓度增加,氢离子与亚铁离子争夺供电子基团,影响螯合物的形成;在碱性环境中,溶液中氢氧根离子与亚铁离子形成氢氧化物沉淀,从而使螯合物和产物得率降低。^[10]因此选取pH为6~8。

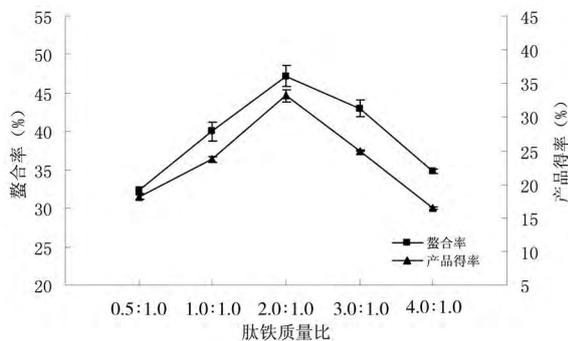


图2 肽铁质量比对蛋白肽亚铁螯合率及产品得率的影响

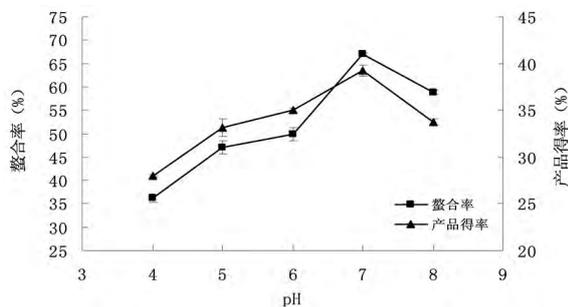


图3 pH值对蛋白肽亚铁螯合率及产品得率的影响

2.1.4 反应时间对螯合反应的影响

由图4可知,随着时间的延长,螯合率和产品得率先上升后下降,当达到20 min时,螯合率和产品得率达到最大,一般金属离子与蛋白肽在溶液中螯合反应速度均很快,在短时间内即能反应完全。因此反应时间选取10~30 min之间。

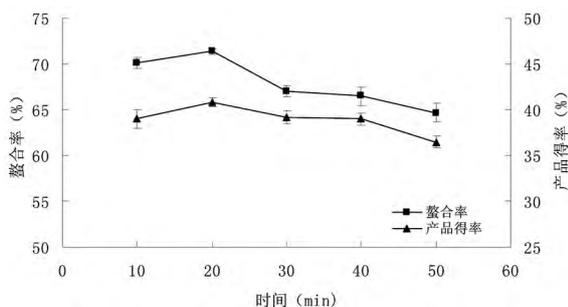


图4 时间对蛋白肽亚铁螯合率及产品得率的影响

2.1.5 温度对螯合反应的影响

由图5可知,当温度为20~30℃时,温度升高会使螯合率和产品得率逐渐增加,这可能是因为温度过低,会导致多肽与Fe²⁺的反应活力下降,使得螯合反应进行缓慢;但多肽与金属离子的螯合反应为放热反应,温度过高会抑制反应的正向进行,促进亚铁离子氧化水解,生成Fe(OH)₃沉淀,螯合率和产物得率下降,产物的稳定性也受到一定影响。^[2,9]

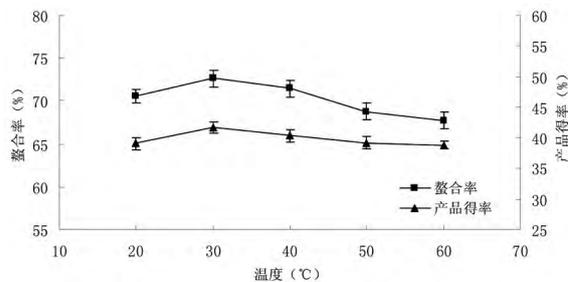


图5 温度对蛋白肽亚铁螯合率及产品得率的影响

2.1.6 乙醇用量对螯合反应的影响

由图6可知,随乙醇的体积倍数增大,螯合率和产品得率先增加后趋于稳定。这主要是因为当加入的乙醇过少时,螯合物不能沉淀完全;^[9]当加入的乙醇较多时,又会破坏芝麻蛋白肽与亚铁离子的结合,导致螯合率与产品得率略有下降。因此,选用乙醇体积倍数为反应液体积的6倍。

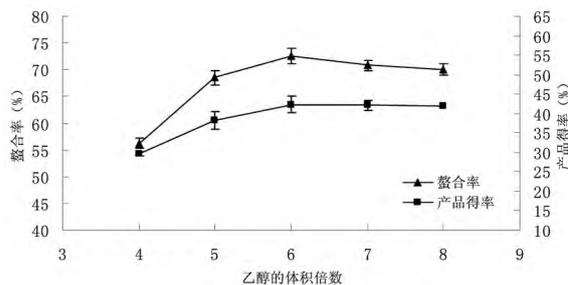


图6 乙醇用量对蛋白肽亚铁螯合率及产品得率的影响

2.2 响应面实验结果及方差分析

响应面实验设计及结果如表2所示。

2.2.1 螯合率分析结果

以螯合率为指标,采用Design-Expert 8.0.6对试验数据进行拟合,得到回归方程如下:

$$Y_1 = 72.21 + 3.45A + 7.89B + 0.16C + 0.090D + 0.050AB - 0.36AC + 0.090AD - 1.15BC - 0.21BD - 2.85CD - 4.82A^2 - 11.00B^2 - 1.51C^2 - 1.47D^2$$

由表 3 可知,模型中 $P < 0.000 1, R^2 = 0.989 3$ 表明此模型极其显著。失拟项 $P = 0.070 9 > 0.05$ 影响不显著,说明结果可靠。由回归方程的显著性检验可知,模型中 $A、B、A^2、B^2$ 对螯合率的影响极显著, $CD、C^2、D^2$ 对螯合率的影响显著,其他因子影响不显著。各因素对亚铁螯合率影响的大小依次为: $B > A > C > D$ 。

表 2 响应面实验设计与结果

实验号	A	B	C (min)	D (°C)	螯合率 (%)	产品得率 (%)
1	-1	1	-1	0	61.73	31.86
2	-1	0	0	1	62.36	31.67
3	0	1	0	1	66.69	35.17
4	0	0	0	0	72.60	43.02
5	1	-1	0	0	49.77	26.51
6	1	0	0	-1	69.89	38.13
7	0	-1	-1	0	51.84	21.32
8	0	0	0	0	72.67	42.65
9	0	-1	1	0	53.48	24.13
10	0	-1	0	-1	52.61	23.52
11	-1	0	0	-1	62.64	32.98
12	1	0	0	1	69.97	38.40
13	0	-1	0	1	53.15	23.83
14	0	0	-1	-1	65.38	31.50
15	0	0	0	0	71.46	41.79
16	0	0	0	0	71.64	42.78
17	0	1	0	-1	67.00	34.76
18	0	0	1	1	66.50	29.90
19	0	0	0	0	72.67	43.17
20	-1	0	1	0	63.45	33.43
21	0	1	1	0	65.84	31.89
22	0	0	-1	1	71.61	37.83
23	0	0	1	-1	71.68	34.39
24	0	1	-1	0	68.82	39.43
25	1	0	-1	0	69.28	37.83
26	1	1	0	0	68.59	41.51
27	1	0	1	0	69.57	39.23
28	-1	1	0	0	62.05	32.97
29	-1	-1	0	0	43.43	21.89

在图 7、图 8 中,当肽铁质量比、pH 值、时间和温度中任意 2 个因素为零水平时,剩下 2 个因素均可对螯合率产生不同程度的影响。^[8]通过曲

面陡峭程度判断因素对响应值影响的显著性。^[10]结果显示:pH 和肽铁质量比对螯合率的影响极显著,随着这 2 个因素值的升高,螯合率均先上升后下降。这与表 3 中的方差分析的结果一致。

表 3 螯合率回归模型及方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
模型	1 777.47	14	126.96	92.67	<0.000 1	**
A	142.90	1	142.90	104.30	<0.000 1	**
B	747.50	1	747.50	545.58	<0.000 1	**
C	0.29	1	0.29	0.21	0.653 5	
D	0.097	1	0.097	0.071	0.793 9	
AB	0.001	1	0.001	0.007	0.933 1	
AC	0.51	1	0.51	0.37	0.551 1	
AD	0.032	1	0.032	0.024	0.880 0	
BC	5.34	1	5.34	3.89	0.068 5	
BD	0.18	1	0.18	0.13	0.722 0	
CD	32.55	1	32.55	23.76	0.000 2	*
A ²	150.58	1	150.58	109.91	<0.000 1	**
B ²	108.71	1	108.71	150.75	<0.000 1	**
C ²	14.83	1	14.83	10.82	0.005 4	*
D ²	14.10	1	14.10	10.29	0.006 3	*
残差	19.18	14	1.37			
失拟项	17.72	10	1.77	4.85	0.070 9	
净误差	1.46	4	0.37			
总和	1 796.66	28				
$R^2 = 0.989 3$		$R^2_{Adj} = 0.978 6$		$CV = 1.82\%$		

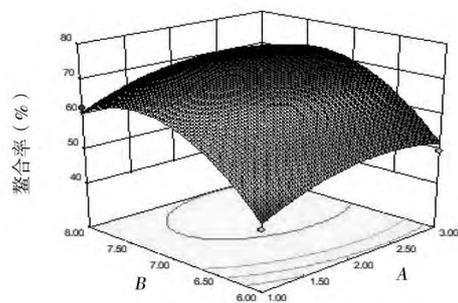


图 7 pH 值和肽铁质量比对亚铁螯合率影响的响应面图

2.2.2 产品得率分析结果

以产品得率为指标,对数据进行拟合,得到回归方程如下:

$$Y_2 = 42.68 + 3.07A + 6.21B - 0.57C + 0.13D + 0.98AB - 0.043AC + 0.39AD - 2.59BC +$$

$$0.025BD - 2.71CD - 2.79A^2 - 8.98B^2 - 4.50C^2 - 4.58D^2$$

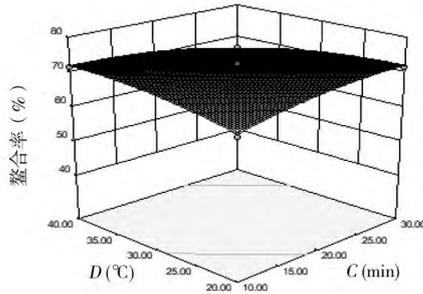


图8 温度和时间对亚铁螯合率影响的响应面图

由表4可知 模型中 $P < 0.0001$ $R^2 = 0.9878$, 说明此模型极其显著。失拟项 $P = 0.0697 > 0.05$ 影响不显著,说明结果可靠。由回归方程的显著性检验可知 模型中 A, B, A^2, B^2 对产品得率的影响极显著, CD, C^2, D^2 对产品得率的影响显著,其他因子影响不显著。

表4 产品得率回归模型及方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
模型	1257.87	14	89.85	81.96	<0.0001	**
A	112.91	1	112.91	103.01	<0.0001	**
B	462.89	1	462.89	422.28	<0.0001	**
C	3.85	1	3.85	3.52	0.0818	
D	0.19	1	0.19	0.18	0.6815	
AB	3.84	1	3.84	3.50	0.0822	
AC	0.007	1	0.007	0.006	0.9364	
AD	0.62	1	0.62	0.57	0.4630	
BC	26.78	1	26.78	24.43	0.0002	
BD	0.003	1	0.003	0.002	0.9626	
CD	29.27	1	29.27	26.70	0.0001	*
A ²	50.60	1	50.60	46.16	<0.0001	**
B ²	522.85	1	522.85	476.97	<0.0001	**
C ²	131.46	1	131.46	119.92	<0.0001	*
D ²	136.32	1	136.32	124.36	<0.0001	*
残差	15.35	14	1.10			
失拟项	14.19	10	1.42	4.90	0.0697	
净误差	1.16	4	0.29			
总和	1273.22	28				
$R^2 = 0.9878$		$R^2_{Adj} = 0.9759$		$CV = 3.07\%$		

利用三维图谱可以直观地显示肽与亚铁盐质

量比、pH、时间和温度对产品得率的影响,如图9所示 响应曲面较陡,肽铁质量比和pH值对螯合物产物得率影响显著。随着这2个因素值的升高,产品得率均先上升后下降。从图10可以看出,温度和时间的交互作用显著,这与回归方程方差分析一致。

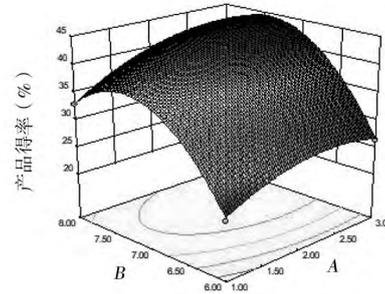


图9 pH值和肽铁质量比对产品得率影响的响应面图

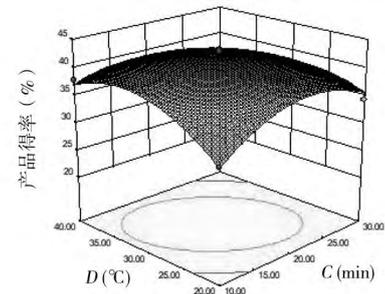


图10 温度和时间对产品得率影响的响应面图

2.2.3 最佳工艺参数的确定及验证实验

由模型方程计算可得,芝麻蛋白肽制备亚铁螯合物的最优方案为:肽铁质量比为3:1、pH为7.41、时间为17.36 min、温度为31.66 °C,螯合率和螯合物产物得率的理论值分别为72.42%、44.60%。根据实验的实际情况和可操作性将螯合条件调整为:肽铁质量比为3:1、pH为7.40、时间为17 min、温度为32 °C。在此条件下,实验重复3次,最终得到的螯合率和螯合物产物得率分别为72.36%、44.09%,与理论值相差不大,说明基于响应面实验所得的优化制备芝麻肽亚铁螯合物的工艺参数是可靠的。

3 结论

本研究探讨了制备芝麻肽亚铁螯合物的工艺条件,结果显示,各因素对螯合效果影响由大到小依次为pH、肽与亚铁盐铁质量比、时间、温度。最佳螯合条件为:V_c与亚铁盐的质量比0.2:1.0、肽

铁质量比3:1、pH7.40、时间17 min、温度32℃、乙醇体积倍数为反应液体积的6倍。在此条件下得到的螯合率和产品得率分别为72.36%、44.09%，与理论值相差不大，因此利用响应面法优化制备芝麻肽亚铁螯合肽的工艺参数是可行的。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] CRISTINA T F, TYIJUIN M A, NALIAR J V. Iron - chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides[J]. Food Chemistry 2012, 134(3): 1585 - 1588.
- [4] LV Y, WEI K H, MENG X G, et al. Separation and identification of iron - chelating peptides from defatted walnut flake by nanoLC - ESI - MS/MS and de novo sequencing[J]. Process Biochemistry 2017, 59(10): 223 - 228.
- [5] 侯利霞, 刘云花, 汪学德, 等. 利用冷榨芝麻蛋白酶解物制备短肽螯合锌的条件优化[J]. 粮油食品科技, 2017, 22(6): 59 - 63.
- [6] 段秀, 杨成涛, 孙云, 等. 罗非鱼皮胶原蛋白肽亚铁螯合修饰及螯合物性质的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(18): 47 - 49.
- [7] 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): 106 - 110.
- [8] 唐英明, 徐丹, 辛松林, 等. 响应面法优化秋葵马芬的制作工艺[J]. 美食研究, 2018, 35(2): 39 - 43.
- [9] 李博, 侯焘, 陈恩民, 等. 脱盐咸鸭蛋清肽 - 亚铁螯合物的制备及表征[J]. 食品工业科技, 2017, 16(38): 117 - 121.
- [10] 黄赛博, 林慧敏, 邓尚贵. 响应面法优化带鱼蛋白多肽螯合亚铁制备工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(4): 266 - 270.

Optimization of preparation process of sesame protein peptide ferrous chelate

HU Qiaoqian, CAO Hui, GE Linli, ZHANG Meng, CHEN Zitong

(College of Tourism and Culinary Science, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

Abstract: In order to optimize the preparation process of sesame protein peptide ferrous chelate, taking sesame protein as raw material and chelating rate and chelating product yield as indicators, the effects of V_c and ferrous salt mass ratio, peptide iron mass ratio, pH value, time, temperature and ethanol dosage on the chelation reaction were investigated. On the basis of single-factor experiments, Box-Behnken response surface analysis method was used to optimize the preparation process of ferrous protein chelating peptides. The optimal chelation reaction condition was: 0.2:1 of the mass ratio of V_c to ferrous salt, 3:1 of the mass ratio of peptide to iron, 7.40 of pH, 17min of time, 32℃ of temperature, and 6:1 of the volumetric ratio of ethanol to the reaction liquid. Under these conditions, the chelation rate was 72.36%, and the chelate product yield was 44.09%.

Key words: Sesame protein peptide; ferrous chelate; chelate; chelate rate

(责任编辑: 赵勇)