

米蛋白肽铁的螯合条件优化*

曹银娣¹, 陈巧云², 熊 华¹, 李 亮¹

1(南昌大学教育部食品科学重点实验室, 江西 南昌, 330047)

2(江西省轻工业研究所, 江西 南昌, 330040)

摘 要 以米渣为蛋白肽原料, 以 FeSO_4 为铁源制备蛋白肽螯合铁。通过实验确定用复合胰蛋白酶进行限制性酶解, 用酶量为 1%, 理想的酶解工艺条件: 酶解温度 50℃, 固液比 1:5, pH 为 8, 酶解时间 4 h; 通过单因素实验和正交实验, 采用氮气保护措施, 确定了最佳螯合工艺条件: 蛋白肽与亚铁盐的配体摩尔比为 2:1, pH 为 5.0, 反应温度 50℃, 反应时间 40 min。可得到棕灰色粉末状蛋白肽螯合铁, 螯合率为 94.4%。

关键词 米渣, 酶解, 螯合, 蛋白肽铁

米渣是生产糖浆的副产品, 蛋白质含量在 60% 以上, 而且氨基酸组成合理, 是少有的无抗原植物蛋白质来源, 但多年来都被简单地当作饲料处理, 生物利用率不高, 经济价值也很低。限制酶解米渣后, 再经一定处理可以得到分子链不等的肽和一些游离的氨基酸等, 可与 FeSO_4 等无机离子螯合生成复合氨基酸螯合物^[1]。

亚铁离子的螯合物比较稳定, 且易为人或动物的肠胃消化、吸收、转运。氨基酸螯合铁就是一种高生物效价微量元素添加剂, 许多国家在猪饲料应用方面取得很好效果。实践表明, 氨基酸螯合铁能有效提高母猪繁殖性能, 显著降低仔猪死亡率, 改善母猪体况^[2]。

由于水解蛋白肽成分和功能复杂^[3], 对于蛋白肽铁的研究目前尚处于起步阶段。研究以米渣为原料, 通过限制性酶解(水解度控制在 8%~10%)得到蛋白肽(分子质量集中在 200~600 u), 以 FeSO_4 为铁源进行螯合, 过程采用氮保护。通过单因素实验和正交实验探索制备蛋白肽螯合铁的最佳工艺条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

米渣(江西省恒天实业有限公司); 复合胰蛋白酶(活力 4 000 U/g)、中性蛋白酶(活力 130 000 u/g)、风味蛋白酶[活力 500 LAPU/g 诺维信公司(中国)]; 碱性蛋白酶[活力 450 PU/g 诺维信公司(中国)]; 氮气、 FeSO_4 (分析纯)、无水乙醇(分析纯)、铁

粉(分析纯)、0.1 mol/L NaOH 溶液、0.02 mol/L EDTA 溶液、40% 甲醛溶液、二甲酚橙。

1.2 实验仪器

JB-3 型定时恒温磁力搅拌器(上海雷磁新径仪器有限公司); FA1004 电子天平(上海上平仪器公司); 飞鸽牌离心机 AK/QC-058(上海安亭科学仪器厂); 755B 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); DGG-9123AD 台式电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司); PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); RE-52AA 真空旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); DZG-6020 型真空干燥箱(上海森信实验仪器有限公司); 氮气瓶、烧杯若干、锥形瓶若干、移液管; 酸碱滴定管。

1.3 工艺流程

酶解工艺流程: 米渣→加酶→加水→调节 pH 值→调温→酶解(随时调解 pH 值)→灭酶→离心→酶解液→测定蛋白提取率和水解度。

随着酶解的进行, 蛋白质链长降低, 产生了小肽和部分游离的氨基酸, pH 值不断下降, 尤其在酶解初期降得非常快, 要保持酶适宜的酸碱环境, 必需不断调节 pH 值; 灭酶处理时, 要求所选酶必须在碱性环境下活力最大, 不宜采用煮沸法灭酶, 以防止发生美拉德反应, 产生不良物质。实验中采用的灭酶方式为: pH 为 8, 80℃, 灭酶 10 min。

螯合工艺流程: 米渣酶解液→调节 pH 值→氮气保护→加铁粉→加 FeSO_4 →调温→调节 pH 值→螯合(控制 pH 值)→真空蒸发→乙醇析出→真空干燥→蛋白肽铁。

反应过程中, 要防止亚铁的氧化, 仅采取加抗氧化剂的措施还不够, 必须保证反应仪器密封, 采用氮气保护、真空蒸发; 反应结束时, 需冷却后再进行后序

第一作者: 硕士研究生(熊华教授为通讯作者)。

* 长江学者和创新团队发展计划(IRT0540), 南昌市重点科技攻关项目

收稿日期: 2006-11-14, 改回日期: 2007-01-18

操作。

1.4 米渣酶解实验

以水解度和提取率为标准,确定合适的蛋白酶及其使用量。取 10 g 米渣置烧杯中,加入蛋白酶,按一定比例加水后搅拌均匀,调节 pH 值,置合适温度水浴加热,选择酶解因素的影响水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,通过显著性分析,确定最佳酶解工艺条件。

1.5 蛋白肽铁的螯合

选用铁粉作抗氧化剂,在酶解液中加入 FeSO_4 ,选定各因素水平如下:螯合温度分别为 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃,螯合时间分别为 20 min、40 min、60 min、80 min, pH 值为 3、4、5、6、7,蛋白肽与亚铁盐的配体摩尔比为 1:1、2:1、3:1 进行单因素实验,分析各因素对螯合反应的影响,确定影响因素水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验确定复合氨基酸亚铁的最佳螯合工艺条件。

1.6 分析检测方法^[4]

1.6.1 蛋白质提取率(RE)的测定

将酶解液离心(5 000 r/min)15 min,取上清液,65℃真空旋转蒸发至 15~20 mL,移到表面皿,105℃下干燥 2~3h,至恒重。

$$RE/\% = \frac{\text{滤液中的蛋白质含量}}{\text{总蛋白质含量}} \times 100$$

1.6.2 蛋白质水解度(DH)的测定

$$DH/\% = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

h ——蛋白质水解后每克蛋白中被裂解的肽键的毫摩尔数(mmol/g 蛋白质),即为氨基酸含量;

h_{tot} ——每克原料蛋白中肽键的毫摩尔数,即为总氮含量。

总氮含量的测定:凯氏定氮法(GB/T 5009.5—2003)。

氨基氮的含量测定:甲醛滴定法(GB/T 5009.39—2003)。

1.6.3 螯合率的测定

很多氨基酸铁螯合的文献资料显示,直接测定螯合率有以下 2 种方法:(1)EDTA 滴定法:用乙醇提取反应液中游离的铁离子,然后以二甲酚橙做指示剂,用 EDTA 滴定螯合液,计算出被螯合的铁的量,从而确定螯合率;(2)分光光度法:绘制铁离子浓度与吸光度的标准曲线,测定氨基酸铁的吸光度,然后对照标准曲线图,可直接读出氨基酸铁的浓度,得出螯合率。但是由于米渣酶解后所得的蛋白肽成分较为

复杂,与 FeSO_4 螯合得到的蛋白肽铁水溶液的透光度很差,不能直接用紫外分光光度法测得螯合率,而以二甲酚橙做指示剂,用 EDTA 滴定法在滴定终点的判别上也有一定困难。实验采用通过测定未螯合铁离子的浓度间接反应螯合情况的方法,作为螯合工艺条件确定的标准。

(1)EDTA 滴定法^[5],用二甲酚橙做指示剂^[6]。

$$\text{螯合率}/\% = \frac{\text{螯合金属的质量}}{\text{金属总量}} \times 100$$

$$\text{即:螯合率}/\% = \frac{CV_1}{CV_2} \times 100 = \frac{V_1}{V_2} \times 100$$

C ——EDTA 的摩尔浓度;

V_1 ——滴定已螯合金属所用 EDTA 的体积;

V_2 ——滴定总加入金属所用 EDTA 的体积。

(2)分光光度法

取 1 mL 反应液置于离心管内,加 5 mL 无水乙醇摇匀,充分提取,在 4 000 r/min 离心 10min,取上层清液,在 510 nm 波长处测定吸光度。吸光度越大说明螯合率越低。

2 结果与分析

2.1 米渣酶解实验

2.1.1 酶及其用量的确定

参照各种酶的使用条件,分别称取 10 g 米渣,进行实验。研究不同酶对米渣酶解蛋白提取率和水解度的影响。

表 1 不同酶对酶解效果的影响

所用酶种类	水解度 DH/%	蛋白提取率 RE/%	风味
中性蛋白酶	4.0953	53.69	略苦
碱性蛋白酶	4.5016	58.30	苦涩、碱味很大
复合胰蛋白酶	8.9724	57.67	苦
风味蛋白酶	4.3258	53.87	良好

由表 1 可知,使用碱性蛋白酶酶解米渣可以得到较高的蛋白提取率,但是水解度却不高。而由复合胰蛋白酶酶解得到的酶解液水解度有了很大提高,且复合胰蛋白酶是人体需要的蛋白酶,没有毒害作用,同时蛋白提取率也不低。这是由于碱性蛋白酶是内切酶,而复合胰蛋白酶是外切酶,酶解特性不同,考虑下一步实验需要,选用复合胰蛋白酶进行实验。

分别采用米渣质量的 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4% 的加酶量,在相同条件下进行实验,结果如图 1。

根据图 1 显示的结果可知,当用酶量超过 1.0%,酶解液的水解度不再有明显提升,考虑经济节

约,选择用酶量为1.0%进行后序实验。

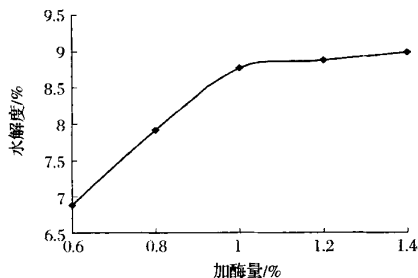


图1 加酶量对水解度的影响

2.1.2 米渣酶解正交实验结果

采用40~60℃、固液比1:5~1:15、酶解时间2~4h, pH7.0~9.0的因素水平进行正交实验(表2),以确定最佳工艺条件。

表2 酶解实验因素水平表

	(A) 温度/℃	(B) 固液比	(C) pH值	(D) 时间/h
1	40	1:5	7.0	2
2	50	1:10	8.0	3
3	60	1:15	9.0	4

表3 正交实验结果和极差分析

实验号	A	B	C	D	DH/%
1	1	1	1	1	6.583 8
2	1	2	2	2	8.352 4
3	1	3	3	3	6.927 7
4	2	1	2	3	8.507 7
5	2	2	3	1	7.359 6
6	2	3	1	2	8.034 2
7	3	1	3	2	7.628 3
8	3	2	1	3	6.722 3
9	3	3	2	1	7.287 7
K ₁	21.863 9	22.719 8	21.340 3	21.231 1	
K ₂	23.901 5	22.434 3	24.147 8	24.014 9	
K ₃	21.638 3	22.249 6	21.915 6	22.157 7	
R	2.263 2	0.470 2	2.807 5	2.783 8	

从正交实验结果的极差分析(表3)可以看出,4因素对水解度的影响顺序为C>D>A>B;最佳试验条件为A₂B₁C₂D₃,即米渣蛋白酶解的最适条件是:酶解温度为50℃,固液比为1:5,pH为8,酶解时间4h;此时蛋白肽液的水解度为8.51%。

2.2 螯合工艺条件单因素实验

2.2.1 温度对螯合反应的影响

温度是影响蛋白肽微量元素络合物形成的主要因素之一,温度太低反应迟缓,过高又易引起亚铁氧化,使螯合率降低,反映在其提取液的吸光度升高,如图2所示。

图2所示。

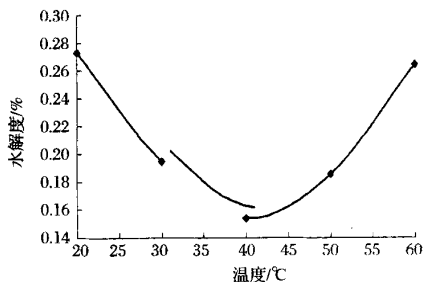


图2 温度对螯合反应的影响

从图2可知,在20~40℃,吸光度随着温度的升高降低,40℃后随着温度的升高而升高,原因可能是温度升高引起铁的氧化反应,致使蛋白肽量不足,螯合率下降。选择30℃、40℃、50℃做正交实验。

2.2.2 时间对螯合反应的影响

蛋白肽与微量元素的络合比较快,理论上讲时间对螯合的影响不是很大,结果见图3。

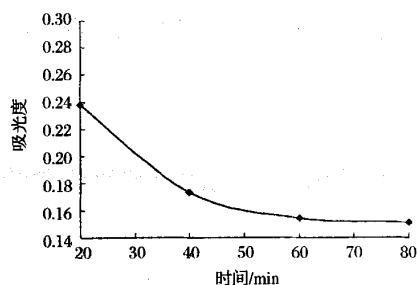


图3 时间对螯合反应的影响

由图3可见,随着螯合时间的延长,提取液的吸光度逐渐降低,60min时螯合已基本完成,故选用40、60、80min进行正交实验。

2.2.3 pH值对螯合反应的影响

pH值是影响蛋白肽微量元素络合物形成的重要因素。pH较低,H⁺将与金属离子竞相争夺金属离子形成氧化物沉淀。选取pH3~7,研究pH值对蛋白肽铁合成反应影响,结果见图4。

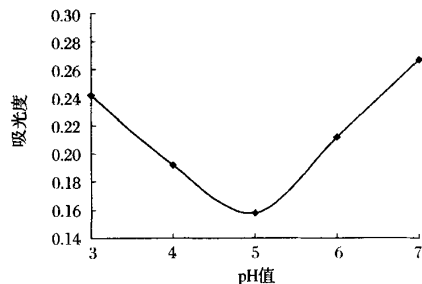


图4 pH值对螯合反应的影响

从图4可看出,在pH值为5时,提取液的吸光度最低;pH值超过5时,吸光度上升很快,这说明在pH 5左右,螯合反应进行顺利,选择pH值分别为4、5、6做正交实验。

2.3 最佳螯合条件确定

为了优化螯合工艺条件,在以上单因素实验基础上采用温度30~50℃、摩尔比1:1~3:1、酶解时间40~80 min和pH4.0~6.0做四因素、三水平的正交实验,以确定最佳工艺条件,选用因素及水平见表4。

表4 螯合条件的因素水平表

	(A) 摩尔比	(B) pH值	(C) 温度/℃	(D) 时间/min
1	1:1	4.0	30	40
2	2:1	5.0	40	60
3	3:1	6.0	50	80

表5 蛋白肽铁的螯合试验结果

实验号	A	B	C	D	吸光度
1	1	1	1	1	0.203
2	1	2	2	2	0.195
3	1	3	3	3	0.154
4	2	1	2	3	0.241
5	2	2	3	1	0.142
6	2	3	1	2	0.163
7	3	1	3	2	0.240
8	3	2	1	3	0.158
9	3	3	2	1	0.308
K_1	0.552	0.684	0.524	0.653	
K_2	0.546	0.495	0.744	0.598	
K_3	0.706	0.625	0.536	0.553	
R	0.160	0.189	0.220	0.10	

从正交实验和极差分析(表5)可得,以上4个因素对提取液吸光度的影响顺序为C>B>A>D;

最佳试验条件为 $A_2B_2C_3D_1$,故其蛋白肽铁的最佳螯合条件为:蛋白肽与亚铁盐的配体摩尔比为2:1,pH为5.0,反应温度50℃,反应时间40 min。此时得到棕灰色粉末产品,测定螯合率为94.4%。

参 考 文 献

- 1 王章存,申瑞玲,姚惠源. 大米蛋白开发利用[J]. 粮食与油脂,2004(1):12~14
- 2 刘鹤翔,黄生强. 不同铁添加剂对母猪生产性能的影响[J]. 科学实验与研究,2003(1):2~4
- 3 Tang S, Hettiarachchy N S, Horax R, et al. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes[J]. Journal of Food Sci, 2003, 68(1): 152~157
- 4 黄伟坤编. 食品检验与分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1993
- 5 刘绍璞等编著. 金属化学分析概论与应用[M]. 成都:四川科学技术出版社,1983
- 6 朱贵云,刘德信编著. 化学试剂知识[M]. 北京:科学出版社,1987
- 7 Tang S, Hettiarachchy N S, Eswaranandam S, et al. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran: I. The role of amylase, celluclast and viscozyme[J]. Journal of Food Sci, 2003, 68(2):471~475
- 8 吴茹怡,曾里,曾凡骏. 复合氨基酸螯合物鉴定方法的研究[J]. 食品科技,2006(3):104~107,112

Optimal Conditions for Preparing Iron Chelate of Enzymic Hydrolysis Peptides from Rice Protein

Cao Yindi¹, Chen Qiaoyun², Xiong Hua¹, Li liang¹

1(The Key Laboratory of Food Science MOE, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

2(The Academe of Light Industry, Nanchang 330040, China)

ABSTRACT Optimal conditions for preparing iron chelator of enzymic hydrolysis peptides from rice protein were investigated by chelating reactions between hydrolytic rice protein and ferrite. The results showed that the optimal conditions of enzymatic hydrolysis of rice dregs (the byproduct of syrup) were: parenzyme of 1%, enzymic hydrolysis temperature at 50℃, ratio of solid/ liquid at 1:5, pH of enzymatic hydrolysis at 8.0, duration of enzymatic hydrolysis for 4h, respectively. The optimal conditions for chelating iron chelate of enzymic hydrolysis peptides were showed as following: molar ratio of hydrolysis peptides and ferrite in 2:1, pH at 5.0, chelating temperature at 50℃, duration of chelating reaction for 40 min. A grey iron chelate of enzymic hydrolysis peptides with a chelating ratio of 94.4% was obtained by nitrogen protected reaction.

Key words rice dregs, enzymatic hydrolysis, iron chelate, peptide of rice protein