

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230010

亚铁结合卵黄高磷蛋白肽的制备及活性分析

宋璐杉, 宋 丽, 朱临娴, 乔赛凤, 张晓维
(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 亚铁结合多肽有利于提高人体对铁离子的吸收。本研究以卵黄高磷蛋白(phosvitin, PV)为原料, 制备具有良好亚铁离子结合能力和抗氧化活性的卵黄高磷蛋白肽(phosvitin peptide, PP)。通过单一酶和复合酶的酶解工艺优化, 确定了最佳酶解工艺条件: 先碱性蛋白酶酶解(添加量 6 000 U/g、50 °C、pH 10、3 h), 再胰蛋白酶酶解(添加量 4 000 U/g、37 °C、pH 8、2 h)。超滤分离 PV 水解产物, 获得不同相对分子质量范围的组分, 测定亚铁结合量、ABTS 和 FRAP 抗氧化活性, 结果表明相对分子质量 < 3 000 的多肽组分最佳, 亚铁结合量为 $(96.14 \pm 2.86) \mu\text{g}/\text{mg}$ 、ABTS 抗氧化能力为 $(955.61 \pm 79.74) \mu\text{mol}/\text{mg}$ 、FRAP 抗氧化能力为 $(62.30 \pm 3.94) \mu\text{mol}/\text{mg}$, 是一种潜在的铁补充剂。

关键词: 卵黄高磷蛋白肽; 亚铁螯合活性; 抗氧化活性; 铁补充剂

中图分类号: TS201.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2023)05-0001-07

Preparation and Activity Analysis of Phosvitin Peptide

SONG Lushan, SONG Li, ZHU Linxian, QIAO Saifeng, ZHANG Xiaowei

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Ferrous binding polypeptide is beneficial to improving the absorption of iron ions in human body. In this study, phosvitin (PV) was used as raw material to prepare phosvitin peptide (PP) with great ferrous ion binding ability and antioxidant activity. The optimal enzymolysis process was determined by optimizing the enzymolysis process of single enzyme and complex enzyme: first alkaline protease (additive amount 6 000 U/g, 50 °C, pH 10, 3h), and then trypsin (additive amount 4 000 U/g, 37 °C, pH 8, 2 h). The PV hydrolysates were separated by ultrafiltration to obtain different molecular weight fractions. The ferrous binding content, and the antioxidant activities of ABTS and FRAP were determined. The results showed that relative molecular mass < 3 000 phosvitin peptide fraction had the best functional features, and the ferrous binding content reached $(96.14 \pm 2.86) \mu\text{g}/\text{mg}$, ABTS value $(955.61 \pm 79.74) \mu\text{mol}/\text{mg}$, and FRAP value $(62.30 \pm 3.94) \mu\text{mol}/\text{mg}$. Phosvitin peptide is a potential iron supplement.

Key words: phosvitin peptide; ferrous chelating activity; antioxidant activity; iron supplement

铁的吸收调控是人体维持机体铁稳态的关键, 铁摄入不足和吸收障碍往往会导致人体缺铁。缺铁性贫血(iron deficiency anemia, IDA)是最常见的营养缺乏症之一, 研究表明 IDA 会导致儿童生长发育抑制^[1]、免疫抑制^[2]、精神疾病^[3]等, 此外, 还会增加孕妇分娩风险、导致老年人器官功能下降等^[4]。因此, IDA 在全球范围内引起了很多国家的关注^[5], 美国、加拿大等国家采用了铁强化小麦面粉等方式补铁^[6], 然而这种补铁方式收效甚微。

人体对铁的吸收主要来源于动物食物的血红素铁和植物食物的非血红素铁, 其中血红素铁的吸收受饮食成分的影响较小, 而非血红素铁的吸收受饮食成分的影响很大^[7]。非血红素铁通常以亚铁离子(Fe^{2+})和铁离子(Fe^{3+})两种形式存在, 通常以 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 络合物的形式存在, 然而只有亚铁离子才能被十二指肠上皮细胞吸收, 铁离子需要被还原成亚铁离子才能被吸收^[8]。血红素铁的吸收机制尚未被完全揭示, 可能依赖于血红素载体蛋白 1(HCP1)和血红素应答基因

收稿日期: 2023-01-17; 修回日期: 2023-05-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801568); 天津市自然科学基金项目(22JCYBJC01090, 21YDTPJC00060)

作者简介: 宋璐杉(1998—), 女, 四川峨眉人, 硕士研究生; 通信作者: 张晓维, 副教授, zhangxw@tust.edu.cn

1 (HRG-1) 转运或受体介导的内吞作用^[9]。因此, 亚铁离子螯合物可能更有利于小肠细胞吸收。

肽与金属离子的螯合物作为新型的矿物质补充剂, 不仅具有良好的稳定性, 而且还能提高金属元素的吸收效果^[10]。卵黄高磷蛋白(phosvitin, PV)是生产磷酸肽的良好来源^[11], 它由 217 个氨基酸残基组成, 其中 124 个为丝氨酸残基, 由于 90% 以上的丝氨酸残基被磷酸化, 因此具有较高的抗氧化活性和金属螯合活性^[12]。研究^[13]表明, 每 100 g 鸡蛋含有 2 mg 铁, 其中有 95% 的铁与 PV 结合, 铁与 PV 结合的化学平衡常数 $K = 10^{18}$ 。PV 因其与金属离子结合不易解离而不利于人体对金属离子的吸收^[14], 酶解后得到的卵黄高磷蛋白肽(phosvitin peptide, PP)能够显著提高 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 的生物利用度^[15]。与 PV 相比, PP 具有更高的抗氧化能力和亚铁螯合能力^[16]。国内外关于 PP 螯合金属离子的研究主要集中在 PP-钙螯合物方面, PP-亚铁螯合物方面的研究相对较少, 因此本研究以 PV 为原料, 优化酶解条件, 超滤分离筛选活性更高的多肽组分, 旨在为进一步开发卵黄高磷蛋白肽亚铁螯合物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜鸡蛋, 天津市滨海新区第十三大街洞庭路明耀超市。

碱性蛋白酶(200 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)、胃蛋白酶(250 U/mg)、总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒、Folin-酚、聚乙二醇(PEG)6000(AR), 北京索莱宝科技有限公司; 氯化亚铁四水合物(GR)、菲罗嗪(AR)、盐酸羟胺(AR), 上海麦克林生化科技有限公司; FRAP 抗氧化能力检测试剂盒, ABTS 抗氧化能力检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 无水碳酸钠(AR)、五水合硫酸铜(AR)、氢氧化钠(AR)等, 国药集团化学试剂有限公司。

H1850 型高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; BK-FD105 型冷冻干燥机, 山东博科生物产业有限公司; MK3 型酶标仪, 美国 BIO-TEK 公司; DKB-501A 型恒温振荡摇床, 上海森信实验仪器有限公司; DK-98-2 型电热恒温水浴锅, 上海虔钧科学仪器有限公司; 实验室 pH 计、电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 超滤离心管(截留相对分子质量 30 000、10 000 和 3 000), 德国 Sartorius 公司。

1.2 方法

1.2.1 卵黄高磷蛋白的制备

采用 NaCl 结合聚乙二醇(PEG6000)沉淀法^[17]制备 PV。收集新鲜鸡蛋的蛋黄液, 加入等质量蒸馏水, 4 °C 磁力搅拌 1 h, 10 000g 离心 10 min, 收集沉淀, 加入等质量 NaCl(0.17 mol/L)溶液, 4 °C 磁力搅拌 1 h, 10 000g 离心 10 min, 再次收集沉淀加入 1.74 mol/L NaCl 溶液(体积质量比为 10), 完全溶解后调节 pH = 4, 添加 PEG6000 至质量分数为 3%, 4 °C 磁力搅拌 1 h, 10 000g 离心 10 min, 取上清液透析 48 h 后再 10 000g 离心 10 min, 取上清液冷冻干燥即为 PV。

1.2.2 卵黄高磷蛋白的酶解工艺优化

选择 3 种蛋白酶酶解 PV, 酶解条件参考表 1。PV 溶解后用 Lowry 法^[18]测定蛋白质质量浓度, 调节 PV 质量分数为 5%, 调节 pH, 加入蛋白酶后转移到恒温振荡摇床, 反应结束后, 95 °C 水浴灭酶 10 min, 冷却至室温。

表 1 3 种蛋白酶的反应条件

Tab. 1 Reaction conditions of three proteases

酶的种类	温度/°C	pH
碱性蛋白酶	50	10.0
胰蛋白酶	37	8.0
胃蛋白酶	37	2.0

单一酶酶解时间的确定: 以 PV 水解度、酶解液的 T-AOC 以及铁螯合活性为指标, 酶添加量为 6 000 U/g, 酶解时间分别控制在 1、2、3、4、5、6 h, 按照表 1 的条件酶解。

单一酶酶添加量的确定: 选择酶的最佳酶解时间, 控制酶添加量分别为 2 000、4 000、6 000、8 000、10 000 U/g, 按照表 1 的条件酶解。

复合酶酶解: 单一酶的酶解条件确定后, 将碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶分步组合确定复合酶的酶解工艺。

1.2.3 卵黄高磷蛋白肽的分级分离

采用截留相对分子质量为 30 000、10 000 和 3 000 的离心超滤管, 7 500g 离心 1 h, 分别得到相对分子质量范围为 >30 000、10 000 ~ 30 000、3 000 ~ <10 000 和 <3 000 的 PP 组分。

1.2.4 多肽及蛋白质含量的测定

采用灵敏度高的 Lowry 法^[18]测定多肽及蛋白质的含量。以 250 μg/mL 的牛乳血清蛋白为标准溶液, 配制成质量浓度为 0、25、50、100、150、200、250 μg/mL 的蛋白溶液, 按 Folin-酚试剂使用说明书进行操作, 在 755 nm 处测定吸光度, 以蛋白质质量

浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。参照 Folin-酚试剂使用说明书的方法测定样品的吸光度,代入标准曲线计算含量。

1.2.5 水解度的测定

以蛋白质在三氯乙酸(TCA)中的溶解度作为PV的水解度(ω_{DH})。将酶解液与等体积20% TCA混合,10 min后10 000g离心15 min,用Lowry法测定上清液中多肽的质量浓度^[19-20]。水解度按照式(1)计算。

$$\omega_{DH} = \frac{\rho_1 \times 2}{\rho_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中: ρ_1 为上清液中多肽的质量浓度, ρ_2 为样品中蛋白质的质量浓度。

1.2.6 亚铁螯合活性和亚铁结合量的测定

采用菲罗嗪分光光度法^[20]测定肽的亚铁螯合活性。向200 μ L酶解液加入800 μ L醋酸钠缓冲液(200 mmol/L, pH 5),再加入40 μ L 2 mmol/L $FeCl_2$ 溶液,振荡摇匀后静置30 min,加入40 μ L 5 mmol/L菲罗嗪溶液,10 min后在562 nm处测定有色络合物吸光度,蒸馏水作空白对照。测定肽结合的亚铁的量^[21]。亚铁螯合活性(d_1)和亚铁结合量(d_2)分别按照式(2)和式(3)计算。

$$d_1 = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \times 100\% \quad (2)$$

$$d_2 = \frac{m_0 - m_1}{m_2} \quad (3)$$

式中: A_0 为空白对照的吸光度; A_1 为样品的吸光度; m_0 为反应液中添加 Fe^{2+} 的质量, μ g; m_1 为未结合多肽的 Fe^{2+} 质量, μ g; m_2 为反应液中多肽的质量,mg。

1.2.7 抗氧化活性分析

T-AOC:用T-AOC检测试剂盒测定酶解液的总抗氧化能力。T-AOC可以反映酶解液还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪产生蓝色 Fe^{2+} -三吡啶三吡嗪的能力。以20 μ mol/L $FeSO_4$ 溶液为标准溶液,按试剂盒说明书操作,以 Fe^{2+} 浓度为横坐标,593 nm处吸光度变化值为纵坐标,绘制标准曲线,测定酶解液T-AOC值,单位为U/mL。

ABTS:以Trolox为标准品进行ABTS抗氧化能力检测,把10 mmol/L Trolox标准溶液稀释成0.15、0.30、0.60、0.90、1.20、1.50 mmol/L,按ABTS抗氧化能力检测试剂盒说明书进行操作,测定734 nm处吸光度变化值,绘制标准曲线,进而求得样品的ABTS抗氧化能力,单位为 μ mol/mg。

FRAP:采用 $FeSO_4$ 作为标准品进行FRAP抗氧

化能力检测,将适量100 mmol/L $FeSO_4$ 溶液稀释为0.15、0.30、0.60、0.90、1.20、1.50 mmol/L,按FRAP抗氧化能力检测试剂盒说明书操作,测定593 nm处吸光度变化值,绘制标准曲线,进而求得样品的FRAP抗氧化能力,单位为 μ mol/mg。

1.3 数据处理

所有实验进行3次平行实验,用SPSS Statistics 21软件处理数据,采用ANOVA对各组数据进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 3种蛋白酶酶解时间对水解度、亚铁螯合活性和T-AOC的影响

卵黄高磷蛋白与酪蛋白有相似的结构与组成,酪蛋白水解后能与铁离子螯合,形成肽-铁螯合物,且该螯合物能被Caco-2细胞良好吸收^[22]。本实验选择了3种不同的蛋白酶水解卵黄高磷蛋白,并对PV的水解度、PP的亚铁螯合活性和T-AOC进行评价。水解度越高,说明酶解后产生的多肽越多;亚铁螯合活性越高,说明多肽结合亚铁离子的活性越高;T-AOC越高,说明多肽还原 Fe^{3+} -三吡啶三吡嗪产生蓝色 Fe^{2+} -三吡啶三吡嗪的能力越强。

水解度是反映蛋白质水解程度的指标,受酶解时间的影响,酶解时间越长,蛋白质水解越彻底,水解度就越高,即多肽含量越多、相对分子质量越小^[23]。3种蛋白酶酶解时间对水解度的影响如图1所示。随着酶解时间的延长,卵黄高磷蛋白的水解度均增大。前4 h水解度增长迅速,之后增长速度趋于平缓。在蛋白酶添加量相同时,3种蛋白酶酶解卵黄高磷蛋白的效果不同,碱性蛋白酶的水解能力最高,胰蛋白酶和胃蛋白酶的水解能力次之。

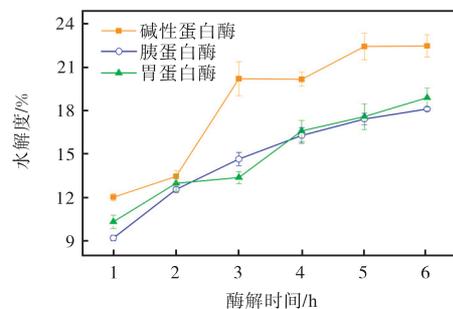


图1 3种蛋白酶酶解时间对水解度的影响

Fig. 1 Effect of hydrolysis time of three proteases on hydrolysis degree

酶的种类和酶解时间会影响酶解液中多肽的种类和含量,从而影响酶解液的亚铁螯合活性^[24]。由于PV与亚铁离子结合不易解离而不利于亚铁的生物利用,本研究关注的是酶解物的活性,因此研究结果不以未酶解的PV作为对照。3种蛋白酶的酶解时间对亚铁螯合活性的影响如图2所示。碱性蛋白酶酶解1h时亚铁螯合活性最高,胰蛋白酶酶解2h时亚铁螯合活性最高,胃蛋白酶对酶解液的亚铁螯合活性影响不大。

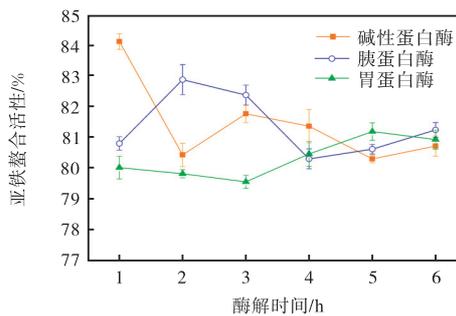


图2 3种蛋白酶的酶解时间对亚铁螯合活性的影响

Fig. 2 Effect of enzymolysis time of three proteases on ferrous chelating activity

蛋白质的抗氧化活性与水解度有关,水解度过大或过小时,抗氧化活性都有可能下降^[25]。3种蛋白酶的酶解时间对T-AOC的影响如图3所示。碱性蛋白酶酶解3~4h, T-AOC最高;随着胰蛋白酶酶解时间的延长, T-AOC逐渐减小;随着胃蛋白酶酶解时间的延长, T-AOC逐渐增大。

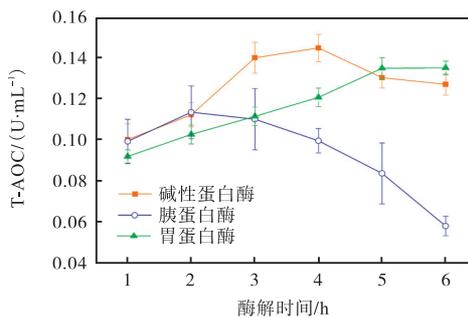


图3 3种蛋白酶的酶解时间对T-AOC的影响

Fig. 3 Effect of enzymolysis time of three proteases on T-AOC

综上所述,尽管碱性蛋白酶酶解1h时,亚铁螯合活性最高,但水解度较低且产生的多肽较少,所以碱性蛋白酶酶解时间取3h,此时亚铁螯合活性和T-AOC均较高。胰蛋白酶酶解2h时,亚铁螯合活性和T-AOC均达到最高,因此胰蛋白酶的酶解时间取2h。由图1—图3可知,胃蛋白酶酶解时,随着酶解

时间的延长,水解度、亚铁螯合活性和T-AOC均缓慢增加,且酶解5h和酶解6h时各指标差异不大,因此胃蛋白酶酶解时间取5h。由于PV不易被酶解,采用单一酶酶解水解度较低,得到的活性多肽较少,因此有必要采用复合酶进行酶解。

2.2 3种蛋白酶的添加量对水解度、亚铁螯合活性和T-AOC的影响

在碱性蛋白酶酶解3h、胰蛋白酶酶解2h、胃蛋白酶酶解5h条件下,探究不同蛋白酶添加量对水解度、亚铁螯合活性和T-AOC的影响,结果如图4—图6所示。

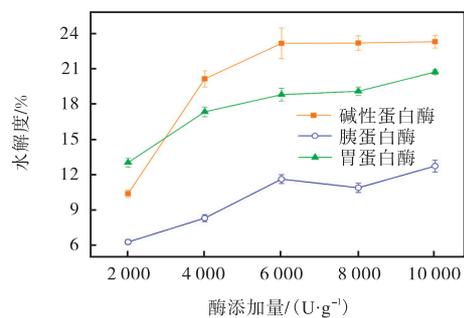


图4 3种蛋白酶添加量对水解度的影响

Fig. 4 Effect of addition amount of three proteases on hydrolysis degree

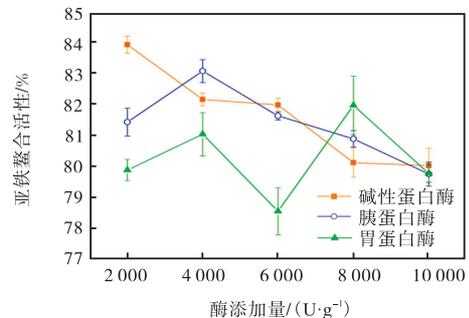


图5 3种蛋白酶添加量对亚铁螯合活性的影响

Fig. 5 Effect of addition amount of three proteases on ferrous chelating activity

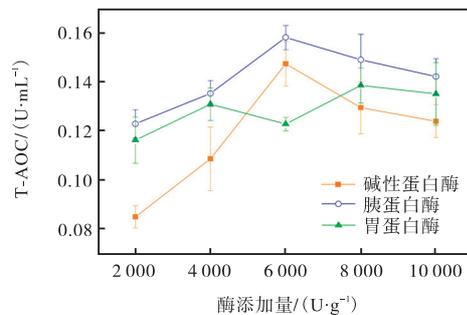


图6 3种蛋白酶添加量对T-AOC的影响

Fig. 6 Effect of addition amount of three proteases on T-AOC

由图 4 可知: 水解度随着酶添加量的增加呈现先增加后趋于平缓的趋势, 当碱性蛋白酶和胰蛋白酶添加量为 6 000 U/g 时, 可能由于酶达到饱和状态, 水解度增加很小。由图 5 可知: 随着碱性蛋白酶添加量的增加, 亚铁螯合活性逐渐减小; 当胰蛋白酶添加量为 4 000 U/g 时, 亚铁螯合活性最高; 胃蛋白酶添加量对亚铁螯合活性的影响不大, 但在添加量为 8 000 U/g 时活性最高。胃蛋白酶添加量为 6 000 U 时, 亚铁螯合活性最弱, 这可能与酶解液中 PP 的相对分子质量有关。由图 6 可知: 碱性蛋白酶和胰蛋白酶添加量在 6 000 U/g 时 T-AOC 最高, 胃蛋白酶添加量在 8 000 U/g 时 T-AOC 活性最高。

综上所述, 碱性蛋白酶添加量选择 6 000 U/g, 胃蛋白酶添加量选择 8 000 U/g。尽管胰蛋白酶添加量在 6 000 U/g 时 T-AOC 最高, 但其亚铁螯合活性显著低于添加量为 4 000 U/g 时。这一方面是由于胰蛋白酶成本较高, 另一方面后续还会进行复合酶优化实验, 所以胰蛋白酶添加量暂时选择 4 000 U/g。

2.3 复合酶酶解对水解度、亚铁螯合活性和 T-AOC 的影响

采用 3 种酶分步酶解, 酶解条件为: 6 000 U/g 碱性蛋白酶酶解 3 h, 4 000 U/g 胰蛋白酶酶解 2 h, 8 000 U/g 胃蛋白酶酶解 5 h。为探究复合酶先后酶解顺序是否会对 PV 酶解物的活性产生影响, 测定了每一步酶解的效果和活性。复合酶酶解对水解度、亚铁螯合活性、T-AOC 的影响如图 7—图 9 所示, 其中每组酶解顺序在图中表示为由左至右, 不同字母表示每一步酶解结果间具有显著差异 ($P < 0.05$)。

由图 7 可知: 复合酶酶解与单一酶酶解相比, PV 的水解度显著性提高, 即复合酶水解更彻底。复合酶酶解的先后顺序会影响水解程度, 组 1 的水解度最高, 其次是组 2 和组 6。组 6 中用复合酶二步酶解(碱性蛋白酶-胰蛋白酶)和三步继续酶解(加入胃蛋白酶)得到的水解度无显著性差异。由图 8 可知: 组 1 和组 6 中前两种酶的酶解产物亚铁结合活性最高且无显著性差异。由图 9 可知: 酶解顺序和组合对 T-AOC 有显著性的影响; 组 6 中仅用前两种酶(碱性蛋白酶-胰蛋白酶)分步酶解的水解物, 得到的 T-AOC 最高; 若三步继续酶解(胃蛋白酶)其 T-AOC 显著下降, 抗氧化活性降低。因此, 二步酶解得到酶解物活性最高。

由以上结果可知, PV 的酶解优化工艺为先 6 000 U/g 碱性蛋白酶酶解 3 h, 再 4 000 U/g 胰蛋白酶

酶解 2 h, 得到的酶解液多肽含量较多且亚铁螯合活性和 T-AOC 均较高。

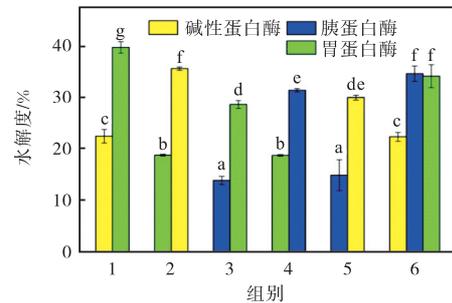


图 7 复合酶酶解对水解度的影响

Fig. 7 Effect of compound enzymatic hydrolysis on hydrolysis degree

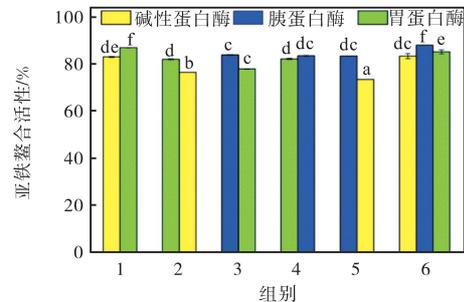


图 8 复合酶酶解对亚铁螯合活性的影响

Fig. 8 Effect of complex enzyme hydrolysis on ferrous chelating activity

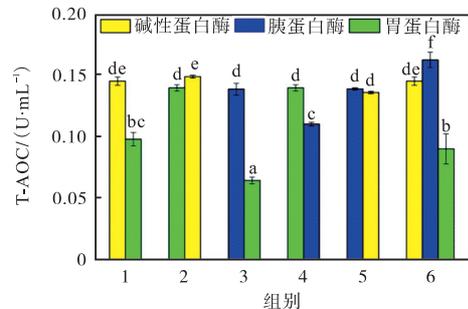


图 9 复合酶酶解对 T-AOC 的影响

Fig. 9 Effect of compound enzymatic hydrolysis on T-AOC

2.4 卵黄高磷蛋白肽不同相对分子质量组分的活性

肽的相对分子质量大小、氨基酸组成及排列顺序是影响肽结合活性的重要原因。由 2~9 个氨基酸形成的寡肽比大分子蛋白质和多肽表现出更强的抗氧化性^[26]。含有 Ser、Lys、His、Glu、Asp、Cys 等的肽链更容易与铁结合, 且相对分子质量越小的多肽越容易通过细胞转运蛋白和细胞膜内吞作用进入小肠上皮细胞^[5], 小相对分子质量肽可能更适合作为铁螯合活性肽应用于铁补充剂。

不同相对分子质量 PP 的 ABTS 抗氧化活性、FRAP 抗氧化活性以及亚铁结合量如图 10—图 12 所示,不同字母表示组间具有显著差异($P < 0.05$)。

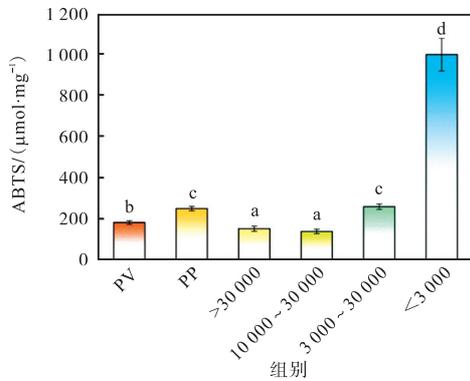


图 10 不同相对分子质量 PP 的 ABTS 抗氧化活性
Fig. 10 ABTS antioxidant activity of PP with different molecular weights

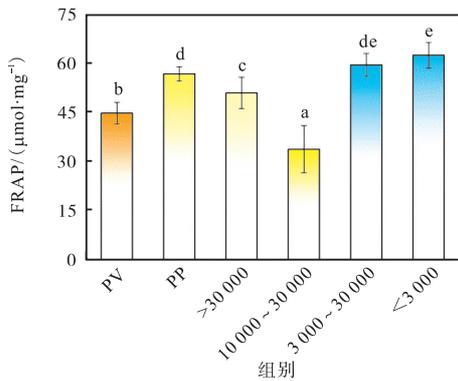


图 11 不同相对分子质量 PP 的 FRAP 抗氧化活性
Fig. 11 FRAP antioxidant activity of PP with different molecular weights

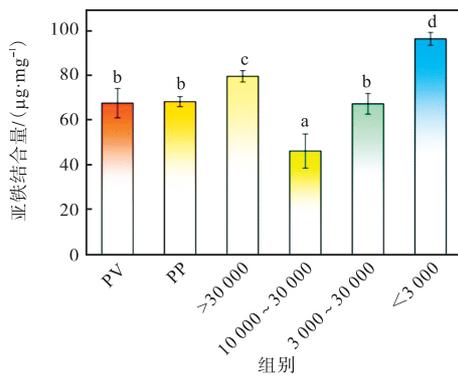


图 12 不同相对分子质量 PP 的亚铁结合量
Fig. 12 Ferrous binding contents of PP with different molecular weights

酶解 PV 后产物活性较酶解前均有不同程度的提高,其中<3000 的卵黄高磷蛋白肽活性显著高于其他多肽组分,ABTS 抗氧化能力为 955.61 $\mu\text{mol}/\text{mg}$,

FRAP 抗氧化能力为 62.30 $\mu\text{mol}/\text{mg}$,亚铁结合量为 $(96.14 \pm 2.86) \mu\text{g}/\text{mg}$ 。对比文献[27]的 7 种小肽可以看出,小分子的 PP 具有良好的抗氧化活性,同时其亚铁结合量显著高于绿豆肽 $(61.25 \pm 1.02) \mu\text{g}/\text{mg}$ [22]、乳清蛋白肽 $(36.42 \mu\text{g}/\text{mg})$ [28],表明 PP (相对分子质量 <3000) 是一种潜在的铁补充剂。

3 结论

酶解卵黄高磷蛋白的最优工艺为:先使用碱性蛋白酶在 pH 10、温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、加酶量 6000 U/g 的条件下水解 3 h,再使用胰蛋白酶在 pH 8、温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、加酶量 3000 U/g 的条件下水解 2 h。此工艺条件下水解度可达 $(34.69 \pm 1.50)\%$ 、亚铁螯合活性为 $(87.89 \pm 0.16)\%$ 、T-AOC 为 $(0.1600 \pm 0.0062) \text{U}/\text{mL}$ 。PP 超滤分级后,相对分子质量 <3000 的 PP 活性最好,ABTS 抗氧化能力为 $(955.61 \pm 79.74) \mu\text{mol}/\text{mg}$,FRAP 抗氧化能力为 $(62.30 \pm 3.94) \mu\text{mol}/\text{mg}$,亚铁结合量为 $(96.14 \pm 2.86) \mu\text{g}/\text{mg}$,表明相对分子质量 <3000 的 PP 是制备铁补充剂的良好来源。

参考文献:

- [1] 张继永. 探讨缺铁性贫血对儿童生长发育的影响[J]. 中国医药指南, 2015, 13(28): 146.
- [2] HASAN H T, AHMED B M, AHMED K N, et al. Impact of iron deficiency anemia on the function of the immune system in children[J]. Medicine, 2016, 95(47): e5395.
- [3] CHEN M H, SU T P, CHEN Y S, et al. Association between psychiatric disorders and iron deficiency anemia among children and adolescents: a nationwide population-based study[J]. BMC Psychiatry, 2013, 13: 161.
- [4] 中国营养学会缺铁性贫血营养防治专家共识工作组. 缺铁性贫血营养防治专家共识[J]. 营养学报, 2019, 41(5): 417-426.
- [5] WU W, YANG Y, SUN N, et al. Food protein-derived iron-chelating peptides: the binding mode and promotive effects of iron bioavailability[J]. Food research international, 2020, 131: 108976.
- [6] WU L, ZOU Y, MIAO Y, et al. Dietary gelatin enhances non-heme iron absorption possibly via regulation of systemic iron homeostasis in rats[J]. Journal of functional foods, 2019, 59: 272-280.
- [7] SHUBHAM K, ANUKIRUTHIKA T, DUTTA S, et al.

- Iron deficiency anemia: a comprehensive review on iron absorption, bioavailability and emerging food fortification approaches[J]. Trends in food science & technology, 2020, 99: 58–75.
- [8] GULEC S, ANDERSON G J, COLLINS J F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption[J]. American journal of physiology, 2014, 307(4): 397–409.
- [9] LIN S T, HU X, YANG X Q, et al. GLPGPSGEEGKR: Fe²⁺ chelating characterization and potential transport pathways for improving Fe²⁺ bioavailability in Caco-2 cells[J]. Food bioscience, 2022, 48: 101806.
- [10] 王孟丽, 布冠好. 肽与金属离子螯合物的研究进展[J]. 食品工业, 2021, 42(5): 323–326.
- [11] ZHAO M, LI S, AHN D U, et al. Phosvitin phosphopeptides produced by pressurized HEA-trypsin hydrolysis promote the differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells via the OPG/RANKL signaling pathways[J]. Poultry science, 2021, 100(2): 527–536.
- [12] 周煌, 郑颖, 金元宝, 等. 鸡蛋蛋黄中主要蛋白质及蛋黄肽的生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(24): 214–217.
- [13] 赵梦蝶. 卵黄高磷蛋白磷酸肽钙复合物的制备及其促钙吸收机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- [14] 宋儒坤, 李斌, 许沙沙, 等. 卵黄高磷蛋白的功能与应用研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(16): 40–42.
- [15] HUANG X, AHN D U. How can the value and use of egg yolk be increased?[J]. Journal of food science, 2019, 84(1/2/3): 205–212.
- [16] 何晨, 王彦超, 常耀光, 等. 功能性蛋黄肽的制备及体外活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(19): 53–56.
- [17] 张晓维. 卵黄高磷蛋白的分离纯化、结构表征及功能特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [18] 国家药典委员会. 《中国药典》2020年版四部通则(草案)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 106.
- [19] SHAHI Z, SAYYED-ALANGI S Z, NAJAFIAN L. Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted *Bunium persicum* Bioss. press cake[J]. Heliyon, 2020, 6(2): e03365.
- [20] YUAN B, ZHAO C, CHENG C, et al. A peptide-Fe(II) complex from *Grifolafrondosa* protein hydrolysates and its immunomodulatory activity[J]. Food bioscience, 2019, 32: 100459.
- [21] ZHANG Y, DING X, LI M. Preparation, characterization and in vitro stability of iron-chelating peptides from mung beans[J]. Food chemistry, 2021, 349(1): 129101.
- [22] FENG F, MINE Y. Phosvitin phosphopeptides increase iron uptake in a Caco-2 cell monolayer model[J]. International journal of food science and technology, 2006, 41(4): 455–458.
- [23] 豆康宁, 石晓, 王飞. 大豆蛋白水解度与大豆肽抗氧化力关系研究[J]. 中国油脂, 2013, 38(10): 20–22.
- [24] 杨雁如, 刘洋, 孙杨赢, 等. 鸭血酶解产物亚铁螯合能力的研究及酶解物的组分分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 179–185.
- [25] 郑德勇, 陈成聪, 颜阳蕾, 等. 茶树籽蛋白质微波辅助酶解制备多肽的研究[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(12): 135–140.
- [26] 夏克东, 刘振锋, 田少君, 等. 鲑鱼皮胶原蛋白肽生理功能的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(17): 163–168.
- [27] 胡晓赞. 小肽抗氧化性及协同作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [28] ATHIRA S, MANN B, SHARMA R, et al. Preparation and characterization of iron-chelating peptides from whey protein: an alternative approach for chemical iron fortification[J]. Food research international, 2021, 141: 110133.

责任编辑: 郎婧