

鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的制备及其特性表征

熊喆¹, 秦子波¹, 赵钰¹, 王希搏², 荣建华¹, 熊善柏^{1,2}, 胡杨^{1,2*}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心, 湖北武汉 430070)

(2. 湖北省生物活性肽工程研究中心, 湖北荆州 434000)

摘要: 该研究将鲢鱼鳞胶原肽与亚铁离子进行螯合, 以螯合率为评价指标, 通过单因素实验结合响应面分析法, 探究胶原肽-铁螯合物的最佳制备条件并对其分子量分布、氨基酸组成和结构进行表征。结果表明: 胶原肽-铁螯合物的最佳制备条件为 pH 值 7.5、肽铁质量比 5:1、肽液质量分数 2.5%、螯合时间 40 min、螯合温度 35 °C, 在此条件下, 铁的螯合率为 92.04%。由分子量分布和氨基酸组成分析可知, 胶原肽与 Fe²⁺ 螯后 1 000 u 以下的分子量占比下降, 胶原肽中存在的谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、缬氨酸和精氨酸对螯合反应具有重要作用; 紫外和红外光谱结果表明, 胶原肽中的羧基、氨基和酰胺基等基团参与了螯合反应; X 射线衍射图谱也显示鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物呈现出不同于胶原肽的非晶形结构。该研究可望为鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的制备、工艺优选及结构表征提供参考。

关键词: 鲢鱼鳞胶原肽; 肽-铁螯合物; 螯合率; 工艺优化; 结构表征

文章编号: 1673-9078(2023)04-187-195

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0553

Preparation and Characterization of Iron-chelating Peptides from Silver Carp Scale Collagen

XIONG Zhe¹, QIN Zibo¹, ZHAO Yu¹, WANG Xibo², RONG Jianhua¹, XIONG Shanbai^{1,2}, HU Yang^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, National Bulk Freshwater Fish Processing Technology Research and Development Sub-center, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2. Bioactive Peptide Engineering Research Center, No.195 Dongfang Ave, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Silver carp scale collagen peptides were chelated with ferrous ions, with the chelation rate as an evaluation index. The optimum preparation conditions for the iron-chelating collagen peptides were explored and their molecular weight distribution, amino acid composition, and structure were characterized via single factor experiments and response surface analysis. The optimal preparation conditions for the iron-chelating collagen peptides were as follows: pH value, 7.5; peptide-iron mass ratio, 5:1; peptide solution mass fraction, 2.5%; chelating time, 40 min; and chelating temperature, 35 °C. Under these conditions, the chelation rate of iron was 92.04%. According to the analysis of molecular weight distribution and amino acid composition, after collagen peptide and Fe²⁺ chelation, the proportion of molecular weight below 1 000 u decreased, with glutamic acid, aspartic acid, alanine, valine, and arginine in the collagen peptides playing important roles in the chelation reaction. Furthermore, the X-ray diffraction patterns showed that iron-chelating peptides from silver carp scale collagen had an amorphous structure, unlike collagen peptide. This study is expected to serve as a reference for the preparation, optimization, and structural characterization of iron-chelating peptides from silver carp collagen.

Key words: silver carp scale collagen peptide; iron-chelating peptides; chelation rate; process optimization; structural characterization

引文格式:

熊喆, 秦子波, 赵钰, 等. 鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的制备及其特性表征[J]. 现代食品科技, 2023, 39(4): 187-195.

XIONG Zhe, QIN Zibo, ZHAO Yu, et al. Preparation and characterization of iron-chelating peptides from silver carp scale collagen [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 187-195.

收稿日期: 2022-05-03

基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目(2022CFB162); 湖北省重点研发计划项目(2021BBA089); 中央高校基本科研业务费专项基金资助(2662018JC019)

作者简介: 熊喆(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 2282121369@qq.com

通讯作者: 胡杨(1987-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工及副产物综合利用, E-mail: huyang@mail.hzau.edu.cn

我国淡水鱼资源丰富, 鲢鱼作为四大家鱼之一, 2020年产量高达381.3万t, 是淡水鱼加工的主要原料^[1]。鱼鳞中富含胶原蛋白, 是生产胶原肽的重要原料之一^[2]。研究表明, 胶原肽具有多种生理活性功能, 如抗衰老、抗肿瘤、降血压、抗氧化、与金属离子螯合等, 被广泛应用于食品、化妆品和生物医药等领域^[3-5]。

铁是人体不可或缺的微量元素, 具有增强免疫力、造血、运输氧气等功能^[6]。人体缺铁时会造成体内含铁酶活性降低和血红素合成减少, 严重影响人体健康^[7]。传统的补铁剂诸如硫酸亚铁、葡萄糖酸亚铁和甘氨酸亚铁等存在性质不稳定, 存在吸收利用率低、副作用大、易刺激胃肠道或价格相对较高等缺陷^[8]。因此, 寻求一种吸收利用率高、无副作用的补铁剂迫在眉睫。研究发现, 肽可与金属元素螯合形成一种性质稳定的肽-金属螯合物, 这种螯合物不仅溶解度好, 对金属离子的吸收利用率高, 还能避免金属离子在胃肠道中产生沉淀, 这为解决人体缺铁问题提供了一种新的途径^[9]。

近年来, 关于肽-金属元素螯合物的研究有诸多报道, 如海参肽螯合锌、酪蛋白磷酸肽螯合钙、牛骨胶原肽螯合钙等^[10-12], 大多数研究主要集中在肽与钙、锌元素的螯合上, 而与亚铁元素螯合的研究较少。有限的报道局限于草鱼、罗非鱼或阿拉斯加鳕鱼皮/鳞等制备的胶原肽-铁螯合物, 对于采用鲢鱼鳞胶原肽与亚铁反应制备肽-铁螯合物尚无系统报道, 鉴于不同来源胶原肽的氨基酸构成存在一定差异, 这可能会进一步导致胶原肽与亚铁离子的螯合效果不同, 因此系统研究鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的制备及其特性表征, 对于鲢鱼加工副产物的高值化利用有较好的指导意义。本文以鲢鱼鳞胶原肽(SCSCP)和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 为原料, 考察反应时间、温度、pH值、肽铁质量比和肽液质量分数对铁螯合率的影响。并在单因素基础上进行响应面优化, 探索了鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的最佳制备条件, 同时对其结构进行了表征。本研究可望为鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的制备、工艺优选及结构表征提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 实验原料

鲢鱼鳞购于华中农业大学菜市场; 四水合氯化亚铁、抗坏血酸、无水乙醇、六水合硫酸亚铁铵、盐酸羟胺、1,10-邻菲罗啉、盐酸、氢氧化钠等购于国药化学试剂有限公司均为分析纯试剂。

1.1.2 主要仪器

AUY220型分析天平, 岛津企业管理(中国)有

限公司; AvantiJ-2型高速冷冻离心机, 美国贝克曼公司; 18角度激光光散射仪, 美国怀雅特技术公司; A300型全自动氨基酸分析仪, 德国曼默博尔公司; UV-1750型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; Nexus 470红外分光光度计, 赛默飞世尔科技公司; D8ADVANCE X射线衍射仪, 德国布鲁克BRUKER公司。

1.2 试验方法

1.2.1 鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的制备

(1) 鲢鱼鳞胶原肽的制备

鲢鱼鳞胶原肽粉参考实验室前期制备工艺^[13], 具体流程如下: 准确称取一定质量预处理过的鲢鱼鳞, 加入蒸馏水调节底物浓度, 用盐酸或氢氧化钠调节起始pH值为8.0~8.5, 加入420U/g碱性蛋白酶后混匀, 并在磁力搅拌器中酶解4h, 随后水浴灭酶15min, 离心, 取上清液过3ku超滤膜, 收集滤液真空浓缩后经喷雾干燥得到胶原肽。喷雾干燥条件为进风温度200℃, 出风温度90℃, 进样量200mL/h。

(2) 鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的制备

参考唐硕博^[14]的工艺稍作修改: 取一定质量的鲢鱼鳞胶原肽粉末, 配制成一定质量分数的多肽溶液, 加入肽液体积1% (m/V)的抗坏血酸作为抗氧化剂, 用1mol/L的盐酸和氢氧化钠调节体系的pH值, 按比例加入 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 后于水浴锅中螯合一段时间, 在4000r/min下离心10min, 取上清液逐渐加入无水乙醇, 静置2h, 在8000r/min下离心10min, 将沉淀真空冷冻干燥即得鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物样品(SCSCP-Fe)。

1.2.2 胶原肽-铁螯合物的单因素试验

将鲢鱼鳞胶原肽与亚铁盐进行螯合, 以肽液质量分数为3%、pH值为6.0、肽与亚铁盐质量比为3:1、螯合温度45℃、螯合时间30min为固定条件, 以铁螯合率为评价指标, 探究螯合温度(25、35、45、55、65℃)、螯合时间(10、20、30、40、50min)、肽液质量分数(1%、2%、3%、4%、5%)、肽与亚铁盐质量比(1:1、2:1、3:1、4:1、5:1)、pH值(4、5、6、7、8、9)对铁螯合率变化的影响。

1.2.3 胶原肽-铁螯合物的响应面优化试验

表1 响应面分析因素及水平

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

代码	因素	水平		
		-1	0	1
A	pH值	7	8	9
B	肽铁质量比	4:1	5:1	6:1
C	肽液质量分数/%	1	2	3

在单因素的基础上,从五个因素中选取对螯合反应有较大影响的三个因素,应用 Box-Behnken 中心组合设计原理进行响应面优化实验,因素水平如表 1 所示。

1.2.4 铁螯合率的测定

参考王莹^[15]的方法,采用邻菲罗啉比色法测定亚铁离子的含量,如式(1)所示,并绘制标准曲线为 $y=0.1114x+0.0391$ ($R^2=0.9999$)

$$F = \frac{C \times V_2}{M \times V_1} \quad (1)$$

式中:

F ——体系中铁离子含量, $\mu\text{g/g}$;

C ——从标准曲线获得溶液相应的铁含量, μg ;

M ——称取样品的质量, g ;

V_1 ——测定所取的溶液体积, mL ;

V ——样品处理后的定容体积, mL 。

样品的测定:取 0.05 g 样品溶解于 2 mL 6 mol/L 的浓盐酸中,定容至 100 mL。吸取 5 mL 的样品溶液于 50 mL 容量瓶中,按标准曲线测定方法测定样品中铁含量。

$$D = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D ——铁螯合率, %;

m_1 ——螯合物中铁的含量, g ;

m_2 ——加入铁的含量, g 。

1.2.5 鲑鱼鳞胶原肽及肽-铁螯合物的结构表征

1.2.5.1 分子量分布测定

参考 GB 31645-2018《食品安全国家标准 胶原蛋白肽》中描述的方法对 SCSCP 和 SCSCP-Fe 的分子量进行测定^[16]。

1.2.5.2 氨基酸组成分析

参考 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》中描述的方法对 SCSCP 和 SCSCP-Fe 的氨基酸组成进行测定^[17]。

1.2.5.3 紫外光谱扫描

将 SCSCP 及 SCSCP-Fe 分别溶解得到 1 mg/mL 的溶液,然后在 190~800 nm 波长范围内进行紫外全波长扫描。

1.2.5.4 傅里叶红外光谱分析

将适量 SCSCP 及 SCSCP-Fe 样品与干燥的纯 KBr 于玛瑙研钵中混合,研磨均匀至乳白色,在 4 000~400 cm^{-1} 的范围内扫描得到红外光谱图。

1.2.5.5 X 射线衍射分析

将 SCSCP 及 SCSCP-Fe 样品研磨均匀,以 10°/min

的扫描速率在 5°~90° 范围内测定样品的 X 射线衍射强度。

1.2.6 数据处理

用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面实验设计,用 SPSS 26 软件对数据进行统计分析,结果取三次试验的平均值,用 Origin Pro 2018 作图。($P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著)。

2 结果与讨论

2.1 胶原肽-铁螯合物的单因素实验结果分析

由图 1 可知,随着螯合时间、螯合温度、肽液质量分数、肽铁质量比和 pH 值的增加,螯合率先上升后下降。其中,螯合时间和时间曲线较平缓,表明对螯合反应的影响较小,分别在 40 min 和 35 °C 时螯合率最大,为 60.48% 和 59.68% (图 1a 和 1b),这与唐顺博等^[14]研究的罗非鱼鳞胶原肽亚铁螯合物的结果一致。

肽液质量分数对螯合反应的影响如图 1c 所示,当肽液质量分数在 1%~2% 时,螯合率从 70.85% 逐渐升高到最大值 73.25% ($P < 0.05$),当多肽液质量分数超过 2% 时,随着肽液质量分数的增大,螯合率显著下降,当肽液质量分数为 5% 时,螯合率下降至 48.63%。这是因为肽液质量分数过低时,肽链与 Fe^{2+} 不能完全螯合,而肽液质量分数过高则导致肽在水中的溶解性变小,参与反应的肽链减少致使螯合率降低导致螯合率显著下降^[18]。因此选择最佳肽液质量分数为 2%。

由图 1d 可知,肽铁质量比从 1:1 逐渐增大至 5:1 的过程中,螯合率从 19.22% 显著升高至最大值 90.73% ($P < 0.05$),继续增大肽铁质量比至 6:1,螯合率呈现下降趋势。这是因为肽铁质量比过低时, Fe^{2+} 含量过多,胶原肽上的结合位点有限,与 Fe^{2+} 未能完全螯合致使螯合率偏低;随着肽铁质量比的增大,溶液中的 Fe^{2+} 含量较少,肽含量过多,多肽与 Fe^{2+} 的螯合达到饱和后还剩部分多肽未参与螯合反应造成肽的利用率不高,致使铁螯合率略有降低^[19]。因此,选择最佳肽铁质量比为 5:1 ($P < 0.05$),这与宋莎莎等^[20]研究的乌鸡肽铁螯合物的结果一致。

如图 1e 所示, pH 值在 4~8 的范围内,随着 pH 值的升高,螯合率从 30.19% 显著升高至最大值 67.00% ($P < 0.05$),继续增大 pH 值至 9,螯合率略有下降,达 60.57%。这是因为当反应体系的 pH 值偏低时,溶液中大量存在的 H^+ 与 Fe^{2+} 竞争争夺供电子基团(即胶原肽分子);当 pH 偏高时,溶液中过多的 OH^- 会与胶原肽分子竞争电子受体(即 Fe^{2+}) 形成氢氧化物沉

淀^[21], 当 pH 值为 8 时, 肽链上的供电子基团 (-COOH 和 -NH₂) 可以充分与 Fe²⁺ 通过配位键形成螯合物^[22], 故选择最佳 pH 值为 8。

由上述结果可知, 各单因素的最佳螯合工艺条件是 pH 值为 8, 肽铁质量比为 5:1, 多肽液质量分数为 2%, 反应时间为 40 min, 反应温度为 35 °C。由于温度和时间对螯合反应的影响较小, 因此选择 pH 值、肽铁质量比、肽液质量分数这三个对螯合率影响较大的因素进行优化实验。

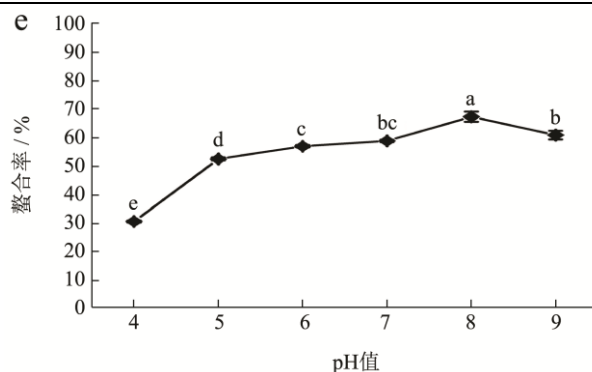
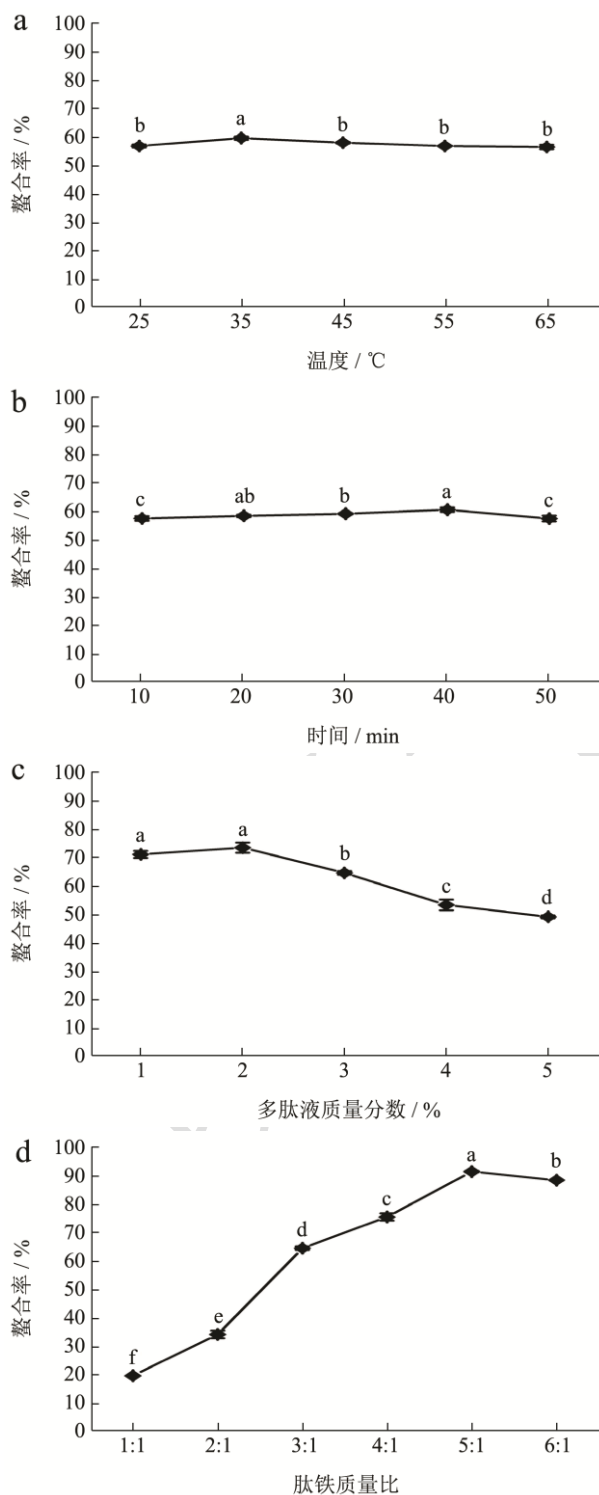


图 1 (a) 时间、(b) 温度、(c) 多肽液质量分数、(d) 肽铁质量比、(e) pH 值对螯合反应的影响

Fig.1 Effects of (a) time, (b) temperature, (c) concentration of polypeptide solution, (d) mass ratio of peptide to iron and (e) pH on the chelation reaction

注: 不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 响应面优化分析

2.2.1 响应面试验设计及结果分析

表 2 响应面实验设计及结果

Table 2 Response surface experiment design and results

序号	A	B	C	Y 螯合率/%
1	1	1	0	75.00
2	-1	1	0	87.96
3	0	0	0	92.07
4	0	-1	-1	86.19
5	0	1	-1	81.00
6	0	1	1	85.70
7	-1	-1	0	84.16
8	1	0	1	83.78
9	1	-1	0	85.03
10	0	0	0	90.65
11	-1	0	1	88.93
12	0	-1	1	84.93
13	-1	0	-1	87.25
14	0	0	0	91.54
15	1	0	-1	83.33
16	0	0	0	90.96
17	0	0	0	93.31

以 pH 值、肽铁质量比、肽液质量分数为响应变量, 以亚铁螯合率 (Y) 为响应值进行响应面试验设计, 结果如表 2 所示。采用 Design-Expert 8.0 软件对响应面优化试验得到的螯合率进行回归拟合及方差分析, 得到的拟合方程为:

$$Y = 91.51 - 2.65A - 1.33B + 0.70C - 3.46AB - 0.31AC + 1.49BC - 3.55A^2 - 4.92B^2 - 2.13C^2$$

表 3 响应面二次模型方差分析

Table 3 ANOVA of response surface quadratic model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	322.91	9	35.88	66.79	<0.000 1	显著
A-pH	55.97	1	55.97	104.18	<0.000 1	**
B-肽铁质量比	14.18	1	14.18	26.39	0.001 3	**
C-肽液质量分数	3.88	1	3.88	7.22	0.031 2	*
AB	47.82	1	47.82	89.00	<0.000 1	**
AC	0.38	1	0.38	0.70	0.429 2	
BC	8.89	1	8.88	16.530 0	0.004 8	**
A ²	53.08	1	53.08	98.80	<0.000 1	**
B ²	101.84	1	101.84	189.56	<0.000 1	**
C ²	19.16	1	19.16	35.66	0.000 6	**
残差	3.76	7	0.54			
失拟项	1.76	3	0.59	1.18	0.422 9	不显著
误差	2.00	4	0.50			
总和	326.68	16				

$R^2=0.987\ 3$, $R^2_{Adj}=0.974\ 7$, C.V%=0.83%

注：“*”表示显著 ($P<0.05$)，“**”表示显著 ($P<0.01$)。

从表 3 模型方差分析可知，模型的 $P<0.01$ ，极显著；失拟项 $P>0.05$ ，不显著，表明模型稳定。由 P 值可知，A、B、AB、BC、A²、B² 和 C² 对铁螯合率的影响极显著 ($P<0.01$)，C 对螯合率的影响显著 ($P<0.05$)。pH 值、肽铁质量比、肽液质量分数均对螯合率有显著影响，比较 F 值大小可知，pH 值对螯合反应的影响最大，肽铁质量比次之，肽液质量分数最小。相关系数 $R^2=0.987\ 3$ ，模型的调整系数 $R^2_{Adj}=0.974\ 7$ ，变异系数为 0.83%，表明模型拟合度好，可以较好地反映各因素和螯合率之间的关系。

2.2.2 响应面图及等高线分析

通过响应面 3D 图的坡度可以判断因素对螯合率影响的显著性；通过等高线的形状可以判断因素之间交互作用的强弱，等高线呈椭圆表示交互作用强，等高线呈圆形表示交互作用弱^[23]。图 2 可以直观的反映出 pH 值、肽铁质量比、多肽液质量分数两两交互作用对样品螯合率的影响。A (pH 值) 和 B (肽铁质量比) 对应的响应面 3D 图的坡度最陡，其等高线呈椭圆形，说明 pH 值和肽铁质量比的交互作用强，对螯合率的影响最大 (图 2a、2b)。同理，A (pH 值) 和 C (多肽液质量分数) 的中心等高线偏圆形，表明 pH 值和多肽液质量分数之间的交互作用较弱，对螯合率的影响较小 (图 2c、2d)。B (肽铁质量比) 和 C (肽液质量分数) 的中心等高线偏椭圆形，其交互作用对螯合率存在较大的影响 (图 2e、2f)。响应面 3D 图和等高线图的变化与表 3 响应面二次模型方差分析中的

AB ($P<0.05$)、AC ($P>0.05$)、BC ($P<0.05$) 项的结果一致，结合 Design-Expert 8.0 软件所得的最佳制备条件为 pH 值 7.60，肽铁质量比为 5.04:1.00，多肽液质量分数为 2.2%，预测螯合物的螯合率为 92.08%。

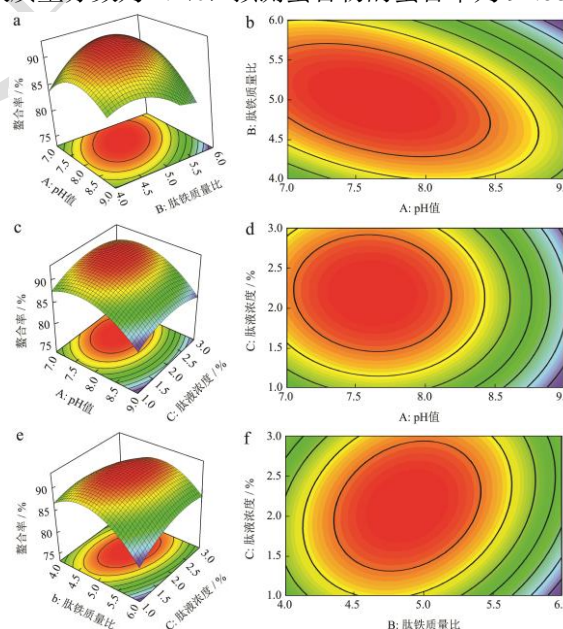


图 2 (a、b) pH 与肽铁质量比、(c、d) pH 值和肽液质量分数、(e、f) 肽铁质量比和肽液质量分数的交互作用对螯合率影响的响应面图及等高线图

Fig.2 Response surface and contour diagram of the effects of the interaction between (a, b) pH and mass ratio of peptide iron, (c, d) pH and concentration of peptide liquid, (e, f) mass ratio of peptide iron and concentration of peptide liquid on the chelation rate

2.2.3 最优解验证

考虑到实际操作的影响,将最佳工艺条件调整为 pH 值 7.5,肽铁质量比 5:1,多肽液质量分数 2.5%,在此条件下进行 3 次重复验证实验,螯合率平均值为 92.04%,与预测值无显著性差异,故采用响应面法所得的最佳螯合工艺条件可靠。

2.3 分子量分布分析

SCSCP 及 SCSCP-Fe 的分子量分布如表 4 所示,在 SCSCP 的分子量分布中小于 1 000 u 的相对含量占 51.76%,与 Fe²⁺螯合后分子量占比下降至 29.58%,而分子量为 1 000 u~3 000 u 和 3 000 u~5 000 u 的相对含量分别由 43.32%和 3.71%增加至 56.77%和 13.52%。这种螯合前后的分子量变化表明胶原肽与 Fe²⁺螯合后会导致分子量较小的肽段聚集转移至更高分子量组分中,因此分布在 1 000 u 以下的占比下降。相关研究表明,分子量分布在 1 000 u 以下的组分与铁螯合能力呈

正相关,这种小肽不仅易被人体吸收还具有较高的金属元素螯合活性^[24,25]。

表 4 鲢鱼鳞胶原肽(SCSCP)及肽-铁螯合物(SCSCP-Fe)的分子量分布

Table 4 Molecular weight distribution of silver carp collagen peptide (SCSCP) and its peptide-iron chelate (SCSCP-Fe)

分子量范围/u	相对含量/%	
	SCSCP	SCSCP-Fe
<180	1.45	2.82
180~500	17.81	8.67
500~1 000	32.51	15.74
1 000~2 000	31.23	30.82
2 000~3 000	12.12	25.96
3 000~5 000	3.71	13.53
>5 000	1.17	2.46

2.4 氨基酸组成分析

表 5 鲢鱼鳞胶原肽(SCSCP)及肽-铁螯合物(SCSCP-Fe)的氨基酸组成

Table 5 Amino acid composition of silver carp collagen peptide (SCSCP) and its peptide-iron chelate (SCSCP-Fe)

类别	氨基酸	相对含量/%	
		SCSCP	SCSCP-Fe
酸性氨基酸	天冬氨酸(Asp)	6.18±0.02 ^b	7.15±0.11 ^a
	谷氨酸(Glu)	8.85±0.12 ^b	10.26±0.10 ^a
碱性氨基酸	赖氨酸(Lys)	4.27±0.05 ^b	4.91±0.10 ^a
	组氨酸(His)	0.89±0.01 ^a	0.64±0.06 ^b
	精氨酸(Arg)	9.05±0.02 ^b	9.71±0.02 ^a
极性性氨基酸	丝氨酸(Ser)	4.00±0.01 ^b	4.38±0.05 ^a
	半胱氨酸(Cys)	0.23±0.20 ^a	0.26±0.07 ^a
	酪氨酸(Tyr)	5.59±0.07 ^a	3.77±0.12 ^b
	苏氨酸(Thr)	3.74±0.05 ^b	4.06±0.05 ^a
非极性氨基酸	甘氨酸(Gly)	16.68±0.12 ^b	18.45±0.09 ^a
	丙氨酸(Ala)	9.68±0.05 ^b	10.53±0.03 ^a
	缬氨酸(Val)	2.70±0.03 ^a	2.44±0.06 ^b
	甲硫氨酸(Met)	2.27±0.01 ^a	0.10±0.08 ^b
	异亮氨酸(Ile)	1.82±0.03 ^a	1.34±0.08 ^b
	亮氨酸(Leu)	0.55±0.01 ^a	0.32±0.08 ^a
	苯丙氨酸(Phe)	2.82±0.01 ^a	1.85±0.15 ^b
	脯氨酸(Pro)	20.73±0.4 ^a	19.81±0.41 ^a

注:同行右肩不同的小写字母表示具有显著差异($P<0.05$)。

肽的氨基酸组成对其铁的螯合能力起着重要作用,诸多报道显示, Glu、Gly、Lys、Asp、Arg 等氨基酸与金属离子的螯合活性密切相关^[25,26]。从表 5 可以看出, SCSCP 和 SCSCP-Fe 中 Pro、Gly、Glu、Ala、Arg、Asp 具有较高的相对含量,且 Gly、Glu、Ala、Arg、Asp 在螯合后含量均有所增加($P<0.05$),分别

提高至 18.45%、10.26%、10.53%、9.71%、7.15%。Asp 和 Glu 上的侧链羧基团改变了局部电荷密度,为 Fe²⁺的螯合创造了合适的环境^[27]。Gly、Ala 这类非极性氨基酸之间的疏水相互作用有助于形成特定的空间结构导致铁的螯合活性较高^[28]。Lin 等^[29]发现 Glu、Asp 和 Lys 在罗非鱼皮胶原肽与铁的螯合中起重要作

用。Sun 等^[25]发现海参卵肽铁螯合物中的 Asp、Arg、His 是起螯合作用的主要氨基酸。因此, SCSCP 上的几个氨基酸, 包括 Glu、Asp、Arg 可能直接参与铁结合; 同时, SCSCP 上的非极性氨基酸 Gly、Ala 之间的疏水相互作用可能有助于形成特定的空间结构。

2.5 UV-vis 分析

有机配体与金属离子形成螯合物后会导致原有吸收峰的位移、消失甚至出现新的吸收峰。SCSCP 和 SCSCP-Fe 的紫外光谱图如图 3 所示。SCSCP 和 SCSCP-Fe 的最大紫外吸收峰对应波长分别为 207.25 nm 和 216.15 nm, 最大吸收峰发生了红移, 表明酰胺键上的氮原子参与了 SCSCP-Fe 螯合物的形成^[25]。此外, SCSCP 在 277 nm 处有一弱吸收峰, 与 Fe²⁺螯合后, 其特征吸收峰消失, 这可能是由于 SCSCP 与 Fe²⁺结合后相关价电子发生跃迁所致^[30]。杨玉蓉等^[31]将桃仁多肽与亚铁离子螯合后, 也发生了吸收峰的偏移与消失现象, 且与本文得出的结论类似。

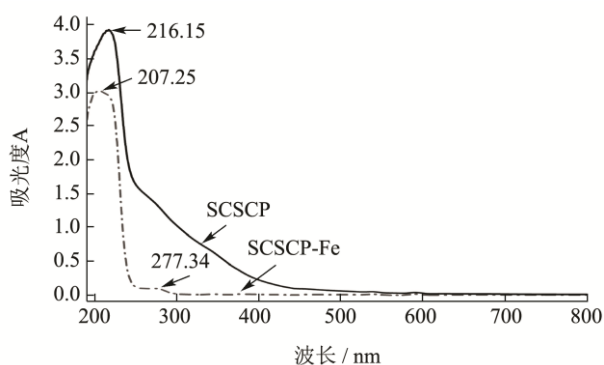


图3 鲢鱼鳞胶原肽 (SCSCP) 及肽-铁螯合物 (SCSCP-Fe) 的紫外光谱图

Fig.3 UV-vis spectra of silver carp collagen peptide (SCSCP) and its peptide-iron chelate (SCSCP-Fe)

2.6 FT-IR 分析

红外光谱图中的胶原肽-铁螯合物特征吸收峰的变化可以反映亚铁离子与配体胶原肽的相互作用。如图 4 所示, 在 SCSCP 的红外光谱中, 3 308.50 cm⁻¹ 显示出酰胺 A 带的 N-H 和 O-H 伸缩振动, 而 SCSCP 与 Fe²⁺螯合后, 该处的伸缩振动吸收峰波数增加至了 3 387.12 cm⁻¹, 且强度增强, 可推测 SCSCP 中的 N 端氨基和侧链中的氨基 (如 Lys、Arg 和 Asp 的残基侧链) 与 Fe²⁺螯合后形成了 N-Fe, 导致 N-H 的振动频率发生了变化^[30]。SCSCP 光谱中的 1 652.95 cm⁻¹、1 534.58 cm⁻¹ 对应于酰胺 I 带 (C=O) 和酰胺 II 带 (N-H 和 C-N), 在 Fe²⁺的作用下分别向移动至 1 648.28 cm⁻¹ 和 1 540.82 cm⁻¹, 可归因于胶原肽中的酰胺键参与了螯

合反应, 这与上述的紫外光谱变化结果一致^[32]。此外, 羧基振动吸收带从 1 398.31 cm⁻¹ 红移至 1 384.29 cm⁻¹, 表明羧基与亚铁离子发生了相互作用形成了 COO-Fe²⁺^[29]。基于以上结果可推测 Fe²⁺与胶原肽可发生多点结合反应, 可通过与羧基氧原子 (-COO⁻) 和氨基氮原子 (-NH₂) 的相互作用结合到 SCSCP 上, 也可与酰胺基上的氮原子发生螯合反应。类似的研究报道, 在罗非鱼皮胶原肽-铁螯合物和海参卵肽-铁螯合物中, 多肽的主要结合部位是羧基氧原子和氨基氮原子^[25,29]。

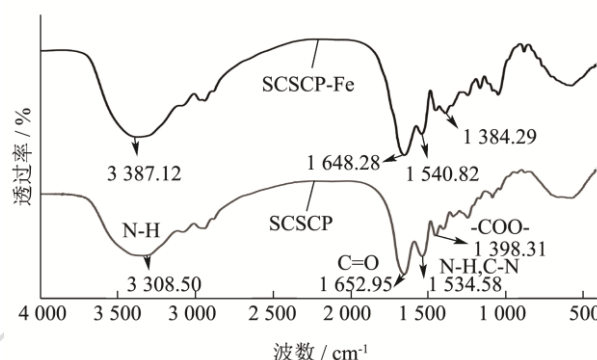


图4 鲢鱼鳞胶原肽 (SCSCP) 及肽-铁螯合物 (SCSCP-Fe) 的红外光谱图

Fig.4 FT-IR spectra of silver carp collagen peptide (SCSCP) and peptide-ferrous chelate (SCSCP-Fe)

2.7 XRD 分析

由图 5 可知, SCSCP 与 SCSCP-Fe 的 X-射线衍射图差异显著。SCSCP 在 20 附近出现了强衍射峰, 与 Fe²⁺螯合后, 螯合物在 20 附近的衍射峰减弱并向大掠射角方向偏移, 在其他地方未出现衍射峰显示出非晶形结构的无定形状态, 由此可以推测胶原肽与亚铁离子不是简单的物理吸附, 而是氨基、羧基发生了配位结合, 这与唐顺博等^[14]的研究结果一致。

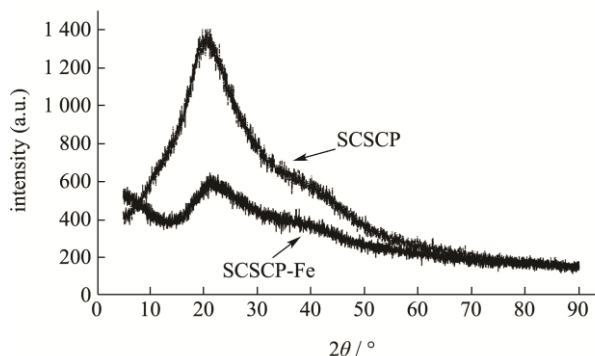


图5 鲢鱼鳞胶原肽 (SCSCP) 及肽-铁螯合物 (SCSCP-Fe) 的 X 射线衍射图谱

Fig.5 X-ray diffraction patterns of silver carp scale collagen peptide and its peptide-iron chelate

3 结论

本研究通过单因素实验结合响应面法探究了鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的最佳制备条件,得到的最优方案为 pH 值 7.5、肽铁质量比 5:1、肽液质量分数 2.5%、螯合时间 40 min、螯合温度 35 °C,在此条件下制备的鲢鱼鳞胶原肽-铁螯合物的螯合率为 92.04%。在此基础上,采用分子量分布、氨基酸组成、紫外光谱、红外光谱、X 射线衍射图比较了螯合前后的结构变化。结果表明,鲢鱼鳞胶原肽与 Fe²⁺螯合后 1 000 u 以下的占比下降,且胶原肽中的天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸和精氨酸在螯合过程中起着重要作用;紫外光谱结合红外光谱显示 Fe²⁺与鲢鱼鳞胶原肽末端的羧基、氨基和酰胺键上的氮原子发生了配位反应,X 射线衍射显示出螯合物是不同于胶原肽的非晶形结构。以上结果均表明,鲢鱼鳞胶原肽与铁通过螯合反应,生成了一种不同于鲢鱼鳞胶原肽的新物质(肽-铁螯合物)。鲢鱼鳞胶原肽可作为一种新型补铁载体材料,为补铁剂的开发提供新的途径,这既拓宽了补铁剂材料的来源又为鱼类副产物中鱼鳞的精加工提供了思路。

参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局.中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2021.
- [2] 蔡路昀,马帅,张宾,等.鱼类加工副产物的研究进展及应用前景[J].食品与发酵科技,2016,52(5):108-113.
- [3] Aguilr-toala J E, Hernandez-mendoza A, Gonzalez-cordova A F, et al. Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products [J]. Peptides, 2019, 122: 170170.
- [4] Halim N R A, Yusof H M, Sarbon N M. Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides: A comprehensive review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 51: 24-33.
- [5] 杨敏,吴兆明,李晶晶,等.鱼皮胶原蛋白寡肽的生物活性及应用研究进展[J].食品科学,2018,39(5):304-310.
- [6] Scott C, Arora G, Dickson K, et al. Iron chelation in local infection [J]. Molecules, 2021, 26(1): 189.
- [7] Pasricha S-R, Tye-Din J, Muckenthaler M U, et al. Iron deficiency [J]. Lancet, 2021, 397(10270): 233-248.
- [8] 毛宇,陈博,顾宁.口服补铁剂的研发现状与发展趋势[J].药学研究,2017,36(11):621-626.
- [9] 富天昕,张舒,盛亚男,等.绿豆多肽锌螯合物的制备及其结构与体外消化的分析[J].食品科学,2020,41(4):59-66.
- [10] Wang Z X, Sun J T, Ma X Y, et al. Characterization of a synthetic zinc-chelating peptide from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its gastrointestinal digestion and absorption *in vitro* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(11): 4542-4550.
- [11] Li H Z, Duan S L, Yuan P, et al. Preparation of casein phosphopeptides calcium complex and the promotion in calcium cellular uptake through transcellular transport pathway [J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(12): e14001.
- [12] Hongru Z, Laiyu Z, Qingshan S, et al. Preparation of cattle bone collagen peptides-calcium chelate and its structural characterization and stability [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 144: 111264.
- [13] 赵钰,余小月,熊喆,等.超声辅助酶解制备草鱼鳞胶原肽及其理化特性评价[J].现代食品科技,2022,38(9):159-170.
- [14] 唐顺博,涂宗财,沙小梅,等.罗非鱼鳞胶原肽亚铁螯合物制备工艺优化及结构表征[J].食品与机械,2020,36(7):155-160.
- [15] 王莹.乳清蛋白肽-铁螯合物制备及结构特性研究[D].大连:大连工业大学,2018.
- [16] GB 31645-2018,食品安全国家标准 胶原蛋白肽[S].
- [17] GB 5009.124-2016,食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定[S].
- [18] 原洪,柴丽琴,王立霞,等.花椒籽肽-铁螯合物的制备及其理化性质[J].食品与发酵工业,2018,44(6):164-171.
- [19] 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,2017,38(16):172-177.
- [20] 宋莎莎,高菲,任迪峰,等.乌鸡肽铁(II)螯合物的制备及红外光谱鉴定[J].食品与发酵工业,2013,39(6):13-17.
- [21] 高敏,汪建明,甄灵慧,等.牛骨多肽螯合物的制备及结构表征[J].食品科学,2020,41(8):256-261.
- [22] 丁媛媛,王莉,张新霞,等.麦胚多肽-钙螯合物制备工艺优化及其结构表征[J].食品科学,2017,38(10):215-221.
- [23] 吴慧琳,李苗云,朱瑶迪,等.酶解发酵酸肉制备抗氧化肽的工艺优化[J].现代食品科技,2020,36(7):173-183,297.
- [24] 刘晓容,郭俊斌,廖婉雯,等.酶法制备乳源钙螯合肽及其特性表征[J].食品研究与开发,2020,41(8):60-67.
- [25] Sun N, Cui P B, Jin Z Q, et al. Contributions of molecular size, charge distribution, and specific amino acids to the iron-binding capacity of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) ovum hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2017, 230: 627-636.
- [26] Zhang Y, Ding X, Li M. Preparation, characterization and *in vitro* stability of iron-chelating peptides from mung beans [J]. Food Chemistry, 2021, 349: 129101.
- [27] Kálay C, Sívégó I, Várnagy K. Nickel (II) complexes of

- oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies [J]. *Polyhedron*, 2007, 26(4): 811-817.
- [28] Sun N, Wang Y, Bao Z, et al. Calcium binding to herring egg phosphopeptides: Binding characteristics, conformational structure and intermolecular forces [J]. *Food Chem*, 2020, 310: 125867.
- [29] Lin S, Hu X, Li L, et al. Preparation, purification and identification of iron-chelating peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin collagen and characterization of the peptide-iron complexes [J]. *Lwt - Food Science and Technology*, 2021, 149: 111796.
- [30] Sun N, Cui P B, Li D M, et al. Formation of crystalline nanoparticles by iron binding to pentapeptide (Asp-His-Thr-Lys-Glu) from egg white hydrolysates [J]. *Food Funct*, 2017, 8(9): 3297-3305.
- [31] 杨玉蓉,李安平,钟政昌,等.桃仁多肽螯合亚铁的结构表征及体外模拟消化[J].*中国食品学报*,2020,20(2):61-69.
- [32] Bandekar J. Amide modes and protein conformation [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1992, 1120(2): 123-143.