

# 鸡肉蛋白钙离子螯合肽酶解工艺的优化研究

魏新颜, 苏国万, 孙为正

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510641)

**摘要:** 本文研究了不同酶解工艺条件对鸡肉蛋白酶解产物钙螯合力的影响。研究了木瓜蛋白酶酶解时间对钙螯合力的影响, 结果表明酶解时间在 3 h 时, 酶解产物有最大钙螯合力。对比了木瓜蛋白酶单酶酶解, 木瓜蛋白酶、风味蛋白酶双酶同步酶解, 及双酶分步酶解三种酶解方式, 发现风味蛋白酶的加入有助于提高产物钙螯合力, 且分步酶解法对产物螯合力提升效果优于同步酶解。针对双酶分步酶解法, 研究了木瓜蛋白酶酶解时间、风味蛋白酶酶解时间、木瓜蛋白酶添加量、风味蛋白酶添加量四个因素对酶解产物钙螯合力的影响, 并以木瓜蛋白酶酶解时间、木瓜蛋白酶添加量、风味蛋白酶添加量为自变量, 酶解产物的钙螯合力为响应值, 设计了三因素三水平响应面实验, 得到最佳酶解工艺条件为: 木瓜蛋白酶酶解时间定为 3.5 h, 风味蛋白酶酶解时间为 2.84 h, 风味蛋白酶添加量为 0.18%。在该条件下酶解产物含有较多的酸性氨基酸及碱性氨基酸, 有利于螯合反应的发生。

**关键词:** 鸡肉蛋白; 酶解; 木瓜蛋白酶; 风味蛋白酶; 肽钙螯合物

文章编号: 1673-9078(2019)08-168-173

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.025

## Effect of Enzymatic Hydrolysis of Chicken Protein on Calcium Chelation Ability of Their Hydrolysates

WEI Xin-yan, SU Guo-wan, SUN Wei-zheng

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**Abstract:** In this work, the effects of enzymatic hydrolysis conditions on the calcium chelation of their hydrolysates were investigated. Results showed that the maximum chelation force was obtained at the enzymatic hydrolysis time of 3 h with papain. The chelation forces of hydrolysates prepared by one-step and two-step enzymatic hydrolysis with papain and flavor enzyme were compared. Results showed that addition of flavor enzyme could improve the calcium chelation of hydrolysates and two-step enzymatic hydrolysis was better than one-step enzymatic hydrolysis. For two-step enzymatic hydrolysis, the effects of the hydrolysis time and enzyme amount on the chelation force were evaluated. The papain enzymatic hydrolysis time, the amounts of papain and flavor enzyme were selected as independent variables, and the calcium chelation force was selected as the response value. The three-factor and three-level response surface experiments were designed. The optimal enzymatic hydrolysis conditions were as follows: the papain enzymatic hydrolysis time of 3.5 h, the flavor enzyme hydrolysis time of 2.84 h, flavor enzyme amount was 0.18%. The amino acid analysis of the hydrolysate obtained by the optimized conditions showed that there were more acidic amino acids and basic amino acids, which was helpful to the chelation reaction.

**Key words:** chicken protein; enzymatic hydrolysis; papain; flavor enzyme; peptide calcium chelate

钙是人体必需的营养素, 约占体重的 1.5%~2.2%, 对骨骼的强度起到重要作用<sup>[1]</sup>。人体可用的钙的最常见形式是离子钙, 例如碳酸钙, 乳酸钙和葡萄糖酸钙<sup>[2]</sup>。离子钙的缺点是它易于在碱性肠环境中形成钙沉淀, 导致膳食钙的吸收和生物利用度严重降低<sup>[3]</sup>。此

收稿日期: 2019-04-14

基金项目: 广东省公益研究与能力建设专项资金项目 (2016B020203001); 广州市科技计划项目对外科技合作计划项目 (201807010102); 广州市珠江科技新星专项 (201610010105)

作者简介: 魏新颜 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品蛋白质利用  
通讯作者: 孙为正 (1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品蛋白质化学与营养

外, 过量摄入碳酸钙可能会导致胃肠道副作用, 包括便秘, 产生气体, 导致胃肠胀气和腹胀<sup>[4]</sup>。氨基酸螯合钙和肽螯合钙在消化时保持可溶且为电中性, 可弥补离子钙的缺点。螯合物中钙的吸收取决于配体, 与氨基酸相比, 肽的吸收具有各种优点, 如耗量少, 运输速度快, 以及载体不易饱和等<sup>[5]</sup>。研究表明酪蛋白磷酸肽 (CPPs) 可与钙形成稳定的可溶性螯合物, 有效促进钙吸收<sup>[6]</sup>。因此, 肽螯合钙是人体补充钙的有效添加物, 可用来改善人体胃肠道中的钙吸收。

根据国家统计局数据, 我国蛋鸡存栏量大, 2018 年约有 11 亿只, 每年产生大量淘汰蛋鸡。淘汰蛋鸡由于产蛋需要及饲养时间长, 其结缔组织含量较高导致

肉质老化、缺乏嫩度,加工性能较差<sup>[7]</sup>。因此,提高淘汰蛋鸡的附加值,对其进行精深加工,对于该行业的发展具有重要意义。淘汰蛋鸡蛋白质含量高,约为16%。生物酶解技术是低值蛋白资源精深加工的有效手段之一<sup>[8]</sup>,利用该技术可制备生物活性肽,提高低值蛋白资源的附加值。

因此,本文以江西白羽鸡淘汰蛋鸡为原料,利用木瓜蛋白酶、风味蛋白酶对鸡肉进行酶解,研究了在不同酶解工艺下所得产物钙螯合力的变化规律,为淘汰蛋鸡制备肽钙螯合物提供方法指导,为淘汰蛋鸡综合利用和精深加工提供新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

实验原料淘汰蛋鸡(江西白羽鸡)为广东温氏食品集团股份有限公司提供。

### 1.2 试剂与设备

#### 1.2.1 试剂

商业用蛋白酶:木瓜蛋白酶、风味蛋白酶均购于广西南宁庞博生物工程有限公司。常规化学试剂均为分析纯。

#### 1.2.2 主要仪器设备

MM12 型绞肉机,广东省韶关食品机械厂;KND-103F 型蛋白质测定仪,上海纤检器厂;SHA-C 水浴恒温振荡器,江苏省金坛市农仪器有限公司;AL204 电子分析天平,瑞士 METTLER TOLEDO 公司;3-18K 高速冷冻离心机,美国 Sigma 公司;数显型 pH 计,瑞士 METTLER TOLEDO 公司;全自动氨基酸分析仪 L8900,日本日立。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 原材料的处理

剔除鸡的内脏、皮、脂肪及骨头后绞成肉糜,分装成每份 100 g 冷冻待用,用之前在流动水下解冻。

#### 1.3.2 单酶酶解鸡肉蛋白

按肉水质量比 1:2 将鸡肉与去离子水混合,木瓜蛋白酶添加量 0.3% (W/W),在 55 °C 下分别酶解 1、2、3、4、5、6 h,酶解后煮沸 10 min 灭酶,酶解液经离心、过滤后即为鸡肉蛋白酶解物。

#### 1.3.3 双酶同步和分步酶解鸡肉蛋白

双酶同步酶解:酶添加量为:木瓜蛋白酶 0.3% (W/W)、风味蛋白酶 0.2% (W/W),其余条件同 1.3.2。

双酶分步酶解:木瓜蛋白酶添加量 0.3% (W/W),

在 55 °C 下酶解 3 h 后调节 pH 至 7.0,加入 0.2% (W/W) 风味蛋白酶,55 °C 下酶解 3 h,其余条件同 1.3.2。

#### 1.3.4 双酶分步酶解单因素试验

木瓜蛋白酶酶解时间:选择酶解时间为 1、2、3、4、5 h 进行单因素试验,木瓜蛋白酶酶解后加入 0.2% (W/W) 风味蛋白酶,55 °C 下酶解 3 h,其余条件同 1.3.3 中双酶分步酶解。

风味蛋白酶酶解时间:木瓜蛋白酶添加量 0.3% (W/W),在 55 °C 下酶解 3 h 后,选择风味蛋白酶酶解时间为 1、2、3、4、5 h 进行单因素试验,其余条件同 1.3.3 中双酶分步酶解。

木瓜蛋白酶添加量:按木瓜蛋白酶添加量 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% (W/W) 进行单因素试验,之后加入 0.2% (W/W) 风味蛋白酶,55 °C 下酶解 3 h,其余条件同 1.3.3 中双酶分步酶解。

风味蛋白酶添加量:木瓜蛋白酶添加量 0.3% (W/W),在 55 °C 下酶解 3 h 后,按风味蛋白酶添加量 0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3% (W/W) 进行单因素试验,其余条件同 1.3.3 中双酶分步酶解。

#### 1.3.5 响应面法实验设计

以木瓜蛋白酶酶解时间以及风味蛋白酶的酶解时间和添加量为自变量,设计三因素三水平响应面实验,实验设计表如表 1。

表 1 响应面实验设计

Table 1 Box-Behnken design

编码	因素	水平		
		-1	0	1
A	木瓜酶时间/h	2.5	3	3.5
B	风味蛋白酶时间/h	2.5	3	3.5
C	风味蛋白酶量/%	0.15	0.2	0.25

#### 1.3.6 钙离子螯合能力的测定

经不同条件处理得到的酶解液,经凯氏定氮法确定蛋白含量后,用去离子水稀释至浓度为 10 mg pro/mL。取 5 mL 酶解液稀释液,加入氯化钙使得蛋白:钙质量比为 1:1。将反应液充分混匀,在 55 °C 水浴 1 h。取出后冷却至室温,向其中加入 45 mL 无水乙醇,充分混匀后静置 3 h。于 4 °C,8000 r/min 下离心 20 min。离心得到的沉淀,经去离子水复溶后,用 GB 5009.92-2016 食品中钙的测定中 EDTA 滴定法测定螯合物钙离子含量。结果用每克蛋白上螯合的钙毫克数表示,即 mg/g 蛋白。

#### 1.3.7 水解度的测定

采用甲醛电位滴定法测定鸡肉蛋白酶解产物中的游离氨态氮含量:

$$\text{水解度} = \frac{\text{酶解产物氨态氮含量} - \text{空白游离氨态氮含量}}{\text{原料总氮含量}} \times 100\%$$

### 1.3.8 氨基酸分析<sup>[9]</sup>

样品中总氨基酸分析参照 Speckann 等方法：将样品酸解后采用 HPLC 分析（测定色氨酸用碱解法）。检测条件：美国 Waters 高效液相色谱，PICO TAG 氨基酸分析柱，温度 38 ℃，流速 1 mL/min，检测波长 254 nm。

### 1.4 数据处理

单因素方差分析采用 SPSS 21 软件的 one-way ANOVA (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 统计分析软件进行数据分析。用最小二乘法比较三组实验均值在 ( $p < 0.05$ ) 水平上是否存在显著性差异。所有数据均表示为平均值±标准偏差 ( $X \pm SD$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 木瓜蛋白酶酶解时间对钙离子螯合力的影响

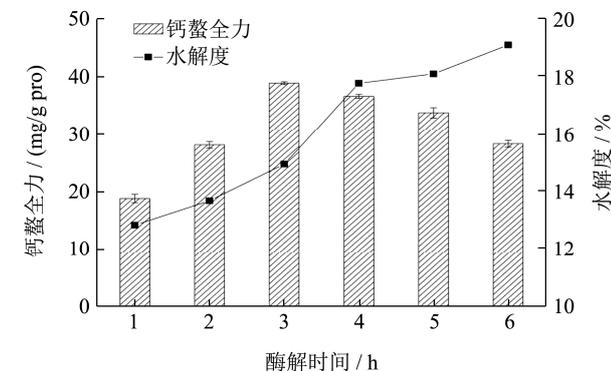


图1 木瓜蛋白酶酶解时间对钙螯合力的影响

Fig.1 Effect of enzymatic hydrolysis time of papain on calcium chelation

由图1可知，随着木瓜蛋白酶酶解时间的延长，酶解产物的水解度逐渐升高，而钙螯合力呈先增大后减小的趋势，并在3h时有最大钙螯合力(38.91 mg/g 蛋白)。酶解过程中鸡肉蛋白被降解成多肽，多肽会被进一步降解成更小分子的肽和氨基酸。在酶解前3h，随着酶解过程的进行，鸡肉蛋白被转化为多肽，暴露出更多的钙螯合活性位点，因此酶解液整体的螯合能力有所提升<sup>[10]</sup>。但随着酶解时间的延长，多肽进一步被降解为分子量更小的多肽、寡肽和氨基酸。刘凤茹<sup>[10]</sup>在研究木瓜蛋白酶水解时间对麦胚蛋白酶解产物钙螯合力的影响时，也发现了类似的现象，在水解的5h内，随着水解时间增长，产物的水解度逐渐增大，

而产物的钙螯合力在水解1h时达到最大，后逐渐下降。研究表明，由于肽链中的羰基与亚氨基也可能参与肽钙螯合反应，多肽的钙离子螯合能力要比氨基酸更强<sup>[11]</sup>。因此，产物的钙离子螯合能力在酶解后期反而下降。研究表明，蛋白肽的钙螯合力与水解度并非正相关的关系，会随着水解度的增加，先增大而后减小<sup>[11]</sup>。

### 2.2 木瓜蛋白酶与风味蛋白酶同步及分步酶解对钙离子螯合力的影响

表2 双酶同步酶解及分步酶解对钙螯合力的影响

Table 2 Effect of one-step enzymatic hydrolysis and two-step enzymatic hydrolysis on calcium chelation

酶解条件	木瓜蛋白酶 单酶酶解	双酶 同步酶解	双酶 分步酶解
钙螯合能力/ (mg/g pro)	38.91±0.23	47.74±0.37	58.21±0.60

表2是木瓜蛋白酶单酶酶解3h、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶同步酶解3h、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶分步各酶解3h三种酶解方式所得产物钙螯合力的对比。由表2可知，对比木瓜蛋白酶单酶酶解法，加入风味蛋白酶后，所得产物的钙螯合力均有提升，同步酶解法的产物钙螯合力为47.74 mg/g 蛋白，提升率为22.68%；双酶分步酶解法产物钙螯合力为58.21 mg/g 蛋白，提升率为49.60%。木瓜蛋白酶是一种内切酶，当作用于鸡肉蛋白将其酶解成多肽，而在此过程中，蛋白内部的天然疏水基团暴露。

在氨基酸螯合盐理论中，以二价阳离子与给电子体的-NH<sub>2</sub>形成配位键，同时又与给电子体的-COOH中的氧原子构成离子键，金属离子和氨基酸之间通过这两种作用使螯合物形成五元环或六元环<sup>[12]</sup>。多肽的钙离子螯合能力，与其酸性或者碱性的基团有关。当多肽表面疏水性基团较多时，一是不利于多肽溶解，二是过多的疏水性基团阻碍了钙与-COOH、-NH基团发生反应。风味蛋白酶是一种外切酶，在食品工业中，常被用于蛋白酶解液的脱苦。风味蛋白酶作用于肽链末端，剪去含疏水性基团的氨基酸，达到降低苦味的目的，提高产品风味的目的<sup>[13]</sup>。利用风味蛋白酶的上述作用，有利于螯合反应的发生。

对比同步酶解和分步酶解，分步酶解的钙螯合力更强。这可能是由于内切酶和外切酶同时存在时，由于空间位阻外切酶不能很好地发挥作用<sup>[14]</sup>。此外，风味蛋白酶和木瓜蛋白酶对于鸡肉酶解的最适pH不同，同步酶解无法保证双酶都在最佳pH。

### 2.3 分步酶解中酶的添加量及酶解时间对钙

#### 离子螯合力的影响

##### 2.3.1 木瓜蛋白酶酶解时间对螯合力的影响

由图2可知,随着木瓜蛋白酶酶解时间的延长,水解度逐渐升高,在3h时达到18.49%,之后水解度增速变缓,在5h时达到20.23%。对于产物的钙螯合力,在前3h,随着水解度的增加,酶解液的钙螯合力逐渐增加,在3h时达到最大值59.76 mg/g 蛋白,随后开始下降,这和之前木瓜蛋白酶单酶酶解的规律类似。相比于木瓜蛋白酶单酶酶解,风味蛋白酶的加入,整体钙离子螯合能力都有提升。

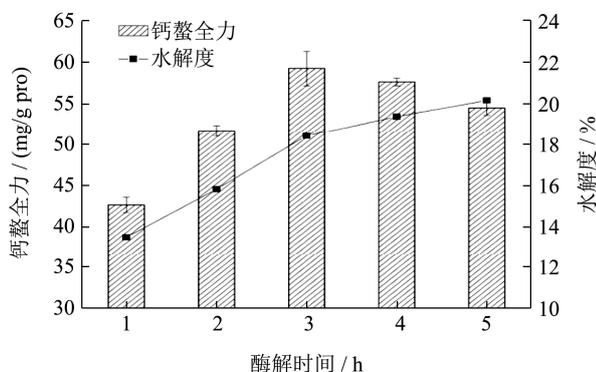


图2 木瓜蛋白酶酶解时间对钙螯合力的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis time of papain on calcium chelation

##### 2.3.2 风味蛋白酶酶解时间对螯合力的影响

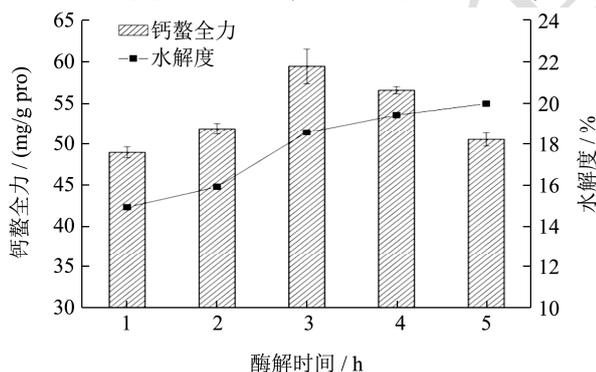


图3 风味蛋白酶酶解时间对钙螯合力的影响

Fig.3 Effect of enzymatic hydrolysis time of flavourzyme on calcium chelation

由图3可知,随着风味蛋白酶酶解时间的延长,酶解产物的水解度逐渐升高,在5h时达到19.79%。而钙螯合力呈先增大后减小的趋势,在3h时有最大值59.43 mg/g 蛋白。酶解前3h,风味蛋白酶的加入可切去肽链末端疏水性基团,使得亲水的羧基和羰基更多暴露,有利于多肽钙离子发生螯合反应。但随着酶解时间延长,多肽逐渐被降解为寡肽和氨基酸,不

利于钙螯合反应的发生。

##### 2.3.3 木瓜蛋白酶添加量对螯合力的影响

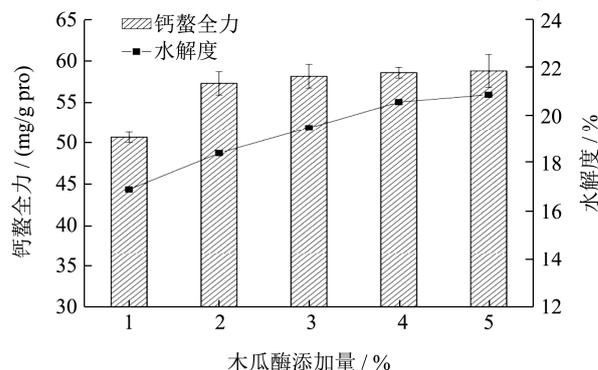


图4 木瓜酶添加量对钙螯合力的影响

Fig.4 Effect of papain addition on calcium chelation

由图4可知,随着木瓜蛋白酶添加量的增加,水解度逐渐上升,当木瓜蛋白酶添加量为0.3%时,水解度为19.45%,继续增加木瓜蛋白酶添加量至0.5%,水解度为20.84%,增大木瓜蛋白酶添加量对水解度带来的提升并不明显,这与之前的研究结论相似<sup>[15]</sup>。

对于产物的钙螯合力,随着木瓜酶添加量的增加,酶解产物的钙离子螯合能力逐渐增大,当添加量为0.3%时,螯合力为58.03 mg/g 蛋白,继续增加木瓜蛋白酶添加量至0.5%,螯合力为58.67 mg/g 蛋白。考虑到木瓜酶添加量的增加对于钙螯合力的提升不明显,以及在实际生产过程中的成本因素,后续实验直接将木瓜蛋白酶添加量控制在0.3%。

##### 2.3.4 风味蛋白酶添加量对螯合力的影响

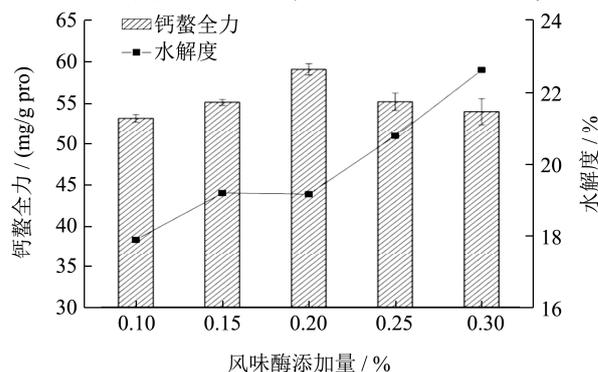


图5 木瓜酶添加量对钙螯合力的影响

Fig.5 Effect of flavourzyme addition on calcium chelation

由图5可知,随着风味蛋白酶添加量的增加,酶解产物的水解度逐渐升高,当风味蛋白酶添加量为0.3%,产物水解度为22.63%。风味蛋白酶作为一种外切酶,对于大分子蛋白的酶解效果并不理想。但经过木瓜蛋白酶预酶解,大分子蛋白得到一定的降解,提升了风味蛋白酶作用效果。

对于产物的钙螯合力,在风味酶添加量0.2%时达到最大值59.09 mg/g 蛋白,继续增加风味酶添加量,

螯合力反而下降。该现象可能也与前述酶解产物中氨基酸含量过大时,产物的钙螯合力反而下降的论证有关,过多的风味酶添加,给产物中带来了过多的氨基酸,反而不利于螯合反应的发生。

## 2.4 响应面法优化酶解工艺

因木瓜蛋白酶添加量的增加对于钙螯合力提升效果不明显,故将木瓜蛋白酶添加量固定在0.3%。以木瓜蛋白酶酶解时间、风味蛋白酶酶解时间、风味蛋白酶添加量3个因素为自变量,以钙螯合力作为响应值,设计了三因素三水平实验。实验结果如表3所示。

对数据进行二次多元回归拟合,得到酶解产物的钙螯合力(Y)与自变量木瓜蛋白酶酶解时间(A)、风味蛋白酶酶解时间(B)、风味蛋白酶添加量(C)之间的二次项回归方程: $Y=59.38+1.97A-1.51B-1.54C-1.60AB-1.91A+0.44BC-4.10A^2-5.15B^2-4.34C^2$ 。

回归方程模型的方差分析及显著性分析结果见表4。从表4可知,回归方程的模型 $P=0.0003$ ,说明回归方程模型具有显著性。失拟项 $p=0.06661$ ,差异不显著,说明模型拟合程度良好。一次项和二次项均显著;交互项AB( $p=0.0570$ ),BC( $p=0.5540$ )不显著,AC( $P=0.0297$ )显著。

$R^2=0.9654$ ,  $R^2(\text{Adj})=0.9209$ ,表明模型能解释92.09%的响应值,回归方程可较好的解释各因素与响应值之间的真实关系。信噪比为11.227,说明模型的

拟合度和可信度较好,可用此模型预测和优化实验结果。

表3 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 3 Box-Behnken design arrangement and experimental results

实验序号	A 木瓜酶时间/h	B 风味蛋白酶时间/h	C 风味蛋白酶添加量/%	钙螯合力/(mg/g pro)
1	1	-1	0	55.19
2	1	0	-1	57.80
3	0	0	0	58.94
4	0	1	-1	49.00
5	-1	-1	0	49.05
6	0	0	0	58.37
7	1	0	1	48.98
8	0	1	1	48.71
9	1	1	0	48.00
10	-1	0	-1	49.05
11	0	-1	1	49.90
12	-1	1	0	48.26
13	-1	0	1	47.89
14	0	0	0	60.53
15	0	-1	-1	51.94
16	0	0	0	59.76
17	0	0	0	59.29

表4 响应面回归模型方差分析表

Table 4 ANOVA for response surface regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F值	p值	
模型	385.96	9.00	42.88	21.71	0.0003	显著
A	30.90	1.00	30.90	15.64	0.0055	
B	18.36	1.00	18.36	9.29	0.0186	
C	18.92	1.00	18.92	9.57	0.0175	
AB	10.23	1.00	10.23	5.18	0.0570	
AC	14.64	1.00	14.64	7.41	0.0297	
BC	0.76	1.00	0.76	0.39	0.5540	
A <sup>2</sup>	70.92	1.00	70.92	35.89	0.0005	
B <sup>2</sup>	111.53	1.00	111.53	56.45	0.0001	
C <sup>2</sup>	79.32	1.00	79.32	40.15	0.0004	
残差	13.83	7.00	1.98			
失拟项	11.14	3.00	3.71	5.53	0.0661	不显著
纯误差	2.69	4.00	0.67			
总和	399.79	16.00				

## 2.5 最优条件验证

响应面法优化得到最优条件为:木瓜蛋白酶酶解

时间定为3.5 h,风味蛋白酶酶解时间为2.84 h,风味蛋白酶添加量为0.18%,在此条件下酶解产物的钙螯合力为 $59.64\pm 1.04$  mg/g 蛋白,与预测值62.45 mg/g 蛋

白接近。

## 2.6 氨基酸分析

表5 酶解液的氨基酸分析

Table 5 Amino acid analysis of enzymatic hydrolysate

氨基酸	含量 /(g/100 g pro)	氨基酸	含量 /(g/100 g pro)
天冬氨酸 Asp	5.41	异亮氨酸 Ile	2.64
苏氨酸 Thr	2.57	亮氨酸 Leu	4.31
丝氨酸 Ser	2.16	酪氨酸 Tyr	1.84
谷氨酸 Glu	6.49	苯丙氨酸 Phe	2.17
甘氨酸 Gly	2.02	组氨酸 His	2.56
丙氨酸 Ala	3.04	赖氨酸 Lys	4.78
半胱氨酸(Cys)2	0.87	精氨酸 Arg	38.31
缬氨酸 Val	2.69	脯氨酸 Pro	3.04
蛋氨酸 Met	1.30	色氨酸 Trp	2.12
酸性氨基酸	11.90	碱性氨基酸	45.65

表5是经过优化后的酶解产物的氨基酸分析,有表可知其含有较多的酸性氨基酸 Lys、Arg、His (11.90 g/100 g pro) 及碱性氨基酸 Asp、Glu、His (45.65 g/g pro)。Jamalian 等<sup>[16]</sup>研究发现 Glu、Asp 残基有利于金属离子的配位结合。Huang 等<sup>[17]</sup>筛选出 Glu-Gly 和 Phe-Asp 两种高钙离子螯合能力的肽。

## 3 结论

研究了木瓜蛋白酶酶解鸡肉时间对水解物钙离子螯合能力的影响,发现鸡肉蛋白肽在酶解 3 h 时有最大钙螯合力。对比了木瓜蛋白酶单酶酶解,木瓜蛋白酶、风味蛋白酶双酶同步酶解,以及双酶分步酶解三种方法对酶解产物钙螯合力的影响,发现风味蛋白酶的加入能提升钙螯合力,而双酶分步酶解所得产物的钙螯合力大于同步酶解。通过响应面优化得到最佳酶解工艺条件为:木瓜蛋白酶酶解时间 3.5 h,风味蛋白酶酶解时间 2.84 h,风味蛋白酶添加量 0.18%。此条件下酶解产物含有较多的酸性氨基酸及碱性氨基酸,有利于钙螯合反应的发生。

## 参考文献

[1] Daengprok W, Garnjanagoonchorn W, Naivikul O, et al. Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(20): 6056-6061

[2] Straub D A. Calcium supplementation in clinical practice: A review of forms, doses, and indications [J]. Nutrition in Clinical Practice, 2007, 22(3): 286-296

[3] Vavrusova M, Skibsted L H. Calcium nutrition bioavailability and fortification [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 59(2): 1198-1204

[4] Straub D A. Calcium supplementation in clinical practice: A review of forms, doses, and indications [J]. Nutrition in Clinical Practice, 2007, 22(3): 286-296

[5] Rerat A, Nunes C S, Mendy F, et al. Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids [J]. British Journal of Nutrition, 1988, 60(1): 121-136

[6] Perego S, Del Favero E, De Luca P, et al. Calcium bioaccessibility and uptake by human intestinal like cells following *in vitro* digestion of casein phosphopeptide-calcium aggregates [J]. Food & Function, 2015, 6(6): 1796-1807

[7] Yu W, Field C J, Wu J. Purification and identification of anti-inflammatory peptides from spent hen muscle proteins Hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2018:253:101-107

[8] 符筋茵,白卫东,刘曜儒,王琴.酶法及美拉德反应改进鸡肉蛋白功能性质的研究[J].现代食品科技,2016,32(9):186-195

FU Jia-yin, BAI Wei-dong, LIU Yao-ru, Wang Qin. Improving the functional properties of chicken protein in maillard reaction by hydrolysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(9): 186-195

[9] Spackman D H, Stein W H, Moore S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids [J]. Federation Proceedings, 1958, 17(4): 1107

[10] 刘凤茹.麦胚蛋白聚集行为及其钙离子螯合肽的制备与评价[D].江南大学,2014

LIU Feng-ru. The aggregation behavior of wheat germ protein and the preparation and evaluation of calcium chelating peptides [D]. Jiangnan University, 2014

[11] Charoenphun N, Cheirsilp B, Sirinupong N, et al. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(1): 57-63

[12] Jamalian A, Sneekes E J, Dekker L J M, et al. Dimerization of peptides by calcium ions: Investigation of a calcium-binding motif [J]. International Journal of Proteomics, 2014, 2014:1-8