

牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁的制备及其结构表征

钟丽雯¹, 鲁迎瑞^{1,3}, 张轶轩², 张卫兵¹, 邵威平¹, 郭兆斌¹, 文鹏程^{1*}

(¹ 甘肃农业大学食品科学与工程学院 兰州 730070)

(² 甘肃燎原乳业集团 甘肃甘南 747000)

(³ 武威高原生物制品有限责任公司 甘肃武威 733000)

摘要 为了充分利用牦牛乳资源,以牦牛乳酪蛋白为原料,采用响应面分析法确定牦牛乳酪蛋白的最佳酰化条件,制备高质量、生物利用率好的蛋白琥珀酸铁制品;采用傅里叶红外光谱、粒径分布、扫描电子显微镜、氨基酸组成、体外模拟消化等手段对制品进行结构表征。结果表明:牦牛乳酪蛋白最佳酰化工艺参数为:酪蛋白与丁二酸酐质量比 2:1,丁二酸酐分 5 次加入,pH 9,反应温度 48 ℃,反应时间 50 min,在此条件下酰化率达到 93.27%,含铁量 8%,螯合率 93.03%。傅里叶红外光谱测定结果显示:蛋白琥珀酸铁与酪蛋白的吸收峰存在差异,酰化蛋白中铁离子与羧基、氨基形成配位键。用激光粒度分布仪测得蛋白琥珀酸铁粒径更大,证实形成螯合物。扫描电子显微镜分析表明样品表面光滑,结构紧密。通过测定蛋白琥珀酸铁的蛋白含量及氨基酸组成,得出蛋白琥珀酸铁较酪蛋白蛋白质损失 28.12%。酪蛋白与蛋白琥珀酸铁中 Glu、Asp 和 Pro 含量较高,其中 Glu 和 Asp 是形成螯合物的关键氨基酸,且生物利用率优于无机盐。本研究结果可为蛋白琥珀酸铁制备以及结构表征提供参考。

关键词 牦牛乳酪蛋白; 蛋白琥珀酸铁; 补铁剂; 酰化修饰; 结构表征

文章编号 1009-7848(2024)08-0247-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.08.024

牦牛主要分布在甘肃、青海、西藏等地,因其独特的生长环境,牦牛乳被称为天然浓缩乳^[1]。牦牛乳中,酪蛋白占总蛋白含量的 80%;牦牛乳酪蛋白的蛋白质含量(4.9%~5.3%)、脂肪含量(5.5%~7.2%)、干物质含量(16.9%~17.7%)等,均高于其它牛乳酪蛋白,同时其中 α -酪蛋白(14.6 g/L)、 β -酪蛋白(16.4 g/L)、 κ -酪蛋白(4.9 g/L)含量以及总酪蛋白含量(49 g/L)也高于其它牛乳酪蛋白^[2-3]。目前,对牦牛乳资源开发利用不够,仍处在研究阶段,且多数采用传统的加工方式生产曲拉、酸乳、干酪等,生物利用率单一,商业化程度有待提高^[4]。本文以牦牛乳酪蛋白为主要原料,制备一种有机螯合铁复合物类蛋白琥珀酸铁制剂,可显著提高酪蛋白的利用率和经济价值。

作为人体必需微量元素之一,铁元素存在于

多个组织和器官中,参与人体血红细胞合成、氧的运输贮存及体内能量代谢等过程^[5-7]。在健康人体内铁含量约为 4 g,若长期缺铁会减少血红细胞生成,造成机体贫血,免疫力低下,进而引发缺铁性贫血等疾病,尤其对于妊娠期女性,为保证自身的血含量和胎儿的生长发育,对铁的需求量大,因此孕妇是缺铁性贫血的高发人群。目前,多糖铁、蛋白铁复合物等有机螯合铁复合物克服了前两代补铁剂吸收差,稳定性差,胃肠道副作用大等缺点,因而被广泛开发和应用。有研究发现^[8],人体中铁主要被吸收的器官是十二指肠和空肠上段,其中 3 价铁离子需经过十二指肠细胞色素 b 还原才能被吸收进小肠上皮细胞。然后,铁会通过基底侧细胞膜上的运铁蛋白释放到循环系统。在这个过程中,铁离子必须与内源或外源的配位体结合成一种螯合物,经过易化扩散后才能被机体消化、吸收和利用。临床研究发现^[9],所有组中,蛋白琥珀酸铁显示出更好的总体疗效,能有效缓解患儿贫血症状,且不良反应发生率较低,有助于及时补充体内铁含量,并具有较高的安全性。

目前,蛋白琥珀酸铁是一种广泛认可的优质补铁产品,是通过将酪蛋白与丁二酸酐反应,再与

收稿日期: 2023-08-05

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1600204-1);
国家自然科学基金地区科学基金项目(32160583);
民生科技专项(2021-0306-NCC-0403);“伏羲
青年英才”项目(Gaufx-02Y01)

第一作者: 钟丽雯,女,硕士生

通信作者: 文鹏程 E-mail: wenpch@126.com

三氯化铁络合制得^[10]。因不同的空间和构象限制,在琥珀酰化过程中影响游离氨基的可用性,而牦牛和普通乳酪蛋白中的氨基数量和反应性质各不相同,牦牛乳酪蛋白的琥珀酰化程度高于普通乳酪蛋白。在琥珀酰化修饰过程中,酪蛋白结构逐渐展开,蛋白质扩散,提高4级结构亚基解离程度,导致等电点下降到较低值,中极性基团数量上升到较高值,使酪蛋白的构象发生变化,同时显现出之前隐藏的氨基,增加了酰化蛋白的结合位点^[11-12]。

目前对蛋白铁螯合物研究较为广泛,然而,以牦牛乳酪蛋白为原料的螯合物极为少见。本研究以牦牛乳酪蛋白为原料,制备牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁,采用单因素实验和响应面法优化牦牛乳酪蛋白酰化工艺,并对螯合前、后的结构进行表征,为牦牛乳酪蛋白最佳酰化条件及蛋白琥珀酸铁的制备工艺及其结构表征提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牦牛乳酪蛋白,酪蛋白含量95.21%,水分含量3.12%,购自甘肃武威高原生物制品有限责任公司,将其置于阴凉干燥,避光,避高温处保存。丁二酸酐、盐酸羟胺、2-2'联吡啶、三氯化铁、硫酸铁铵、茚三酮、邻二氮菲溶液等均为分析纯试剂,购自天津市凯信化学工业有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-2100 紫外-可见分光光度计,上海昶析有限责任公司;FR224CN 精密电子天平,奥豪斯仪器有限公司;pH-3CW 精密 pH 计,上海般特仪器有限公司;H1750R 冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;Nicolet iS50 FTIR 红外光谱仪,美国赛默飞世尔科学公司;Bettersize2600 激光粒度分布仪,丹东百特仪器有限公司;S-3400N 扫描电子显微镜,日本 Hitachi 公司;日立 LA8080 氨基酸分析仪,格雷弗工业装备有限公司;SCIEN-TA-10ND 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;HWS26 型电热恒温水浴锅。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白琥珀酸铁的制备 参照张慧斌^[10]的方法并稍作修改:将牦牛乳酪蛋白溶于10%的氢氧化钠溶液后,加入丁二酸酐,在此过程中用4 mol/

L 氢氧化钠调节 pH 值,搅拌溶解后,离心分离(3 500 r/min, 15 min),上清液用3 mol/L 盐酸调节 pH 值至2.0,沉淀后离心分离,上述步骤重复3次;将沉淀溶于5%氢氧化钠溶液后离心分离,在滤液中加入1.85%三氯化铁溶液,用3 mol/L 盐酸调节 pH 值至2.0,搅拌30 min,离心分离,上述步骤重复3次。将滤液冷冻干燥,得到牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁。

1.3.2 单因素实验 考察牦牛乳酪蛋白与丁二酸酐投料比(1:1,2:1,3:1,4:1,5:1)、丁二酸酐投入次数(5,4,3,2,1次/h)、pH(8.0,8.5,9.0,9.5,10.0)、反应温度(35,40,45,50,55℃)、反应时间(30,40,50,60,70 min)等因素对牦牛乳酪蛋白酰化改性后的酰化率的影响。

1.3.3 响应面试验 在单因素筛选确定的各因素中心水平值的基础上,采用 Box-Behnken 设计方法,以 Y(酰化率)为响应值,选取 pH 值(A)、温度(B)、时间(C)为自变量,设计响应面优化试验,因素水平表见表1。

表1 响应面因素水平表

水平	因素		
	pH 值(A)	温度(B)/℃	时间(C)/min
-1	8.5	35	40
0	9.0	45	50
1	9.5	55	60

1.3.4 评价指标测定

1) 酰化率 采用茚三酮比色法检测牦牛乳酪中蛋白质酰化率,同时参考杨敏等^[13]的研究并作适当修改。取1.00 mL 酰化蛋白溶液,加入1.00 mL 2%茚三酮溶液,随后于沸水中加热5 min,迅速冷却至室温,接着加入5.00 mL 蒸馏水,在波长580 nm 处测定溶液的吸光度,以蒸馏水为参比液。

$$Y(\%) = (a - b) / a \times 100 \quad (1)$$

式中:Y 为酰化程度,%;a 为未酰化蛋白溶液的吸光度;b 为酰化蛋白溶液的吸光度。

2) 铁含量 参考张慧斌^[10]的方法,按外标法计算铁含量。

$$\text{铁含量}(\%) = A_{\text{样}} \times m_{\text{对}} \times 55.847 \times 100 \times 25 / A_{\text{对}} \times 100 \times 482.20 \times m_{\text{样}} (1 - m_{\text{对}}) \times 2 \times 100 \quad (2)$$

式中: $A_{\text{样}}$ 为样品吸光度; $A_{\text{对}}$ 为对照品吸光度; $m_{\text{样}}$ 为对照品称样量,mg; $m_{\text{对}}$ 为对照品称样量,mg。

3) 铁螯合率

$$D(\%) = m_1 / m_2 \times 100 \quad (3)$$

式中: D 为铁螯合率,%; m_1 为螯合物中铁的含量,mg; m_2 为加入铁的含量,mg。

4) 得率

$$Y(\%) = m_a / m_b \times 100 \quad (4)$$

式中: Y 为螯合物得率,%; m_a 为生成物总质量,g; m_b 为加入反应体系的总质量,g。

1.3.5 傅里叶红外光谱检测 将适量冻干后的牦牛乳酪蛋白及蛋白琥珀酸铁放在玛瑙研钵中,将其研磨至粒度 $2.5 \mu\text{m}$ 以下,在波数范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$,分辨率 4 cm^{-1} ,对牦牛乳酪蛋白及牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁进行傅里叶红外光谱测定。

1.3.6 粒径分布测定 采用激光粒度分布仪进行测定牦牛乳酪蛋白和蛋白琥珀酸铁的粒径,采用超纯水清洗设备并作零点校准。在测量过程中,超纯水被用作分散液,平衡时间 120 s ,样品的折射率为 1.52 ,介质的折射率为 1.33 。将处理后的待测样品缓慢注入样液池中,使遮光率保持在 $10\% \sim 15\%$ 范围,在每个样品扫描 3 次,求平均值。

1.3.7 扫描电子显微镜检测 考虑到样品的导电性较弱,需将样品均匀涂抹在样盘上进行喷金镀膜处理。随后,施加电压以聚焦清晰,然后在放大 2000 倍的条件下观察微观形貌,拍照。

1.3.8 蛋白质含量的测定 采用考马斯亮蓝 G250 与蛋白质结合的方法定量测定蛋白质含量。参考蒋大程等^[14]的方法,以标准蛋白质浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。如图 2 所示,BSA 标准曲线为 $y = 0.003x - 0.0039$, $R^2 = 0.9982$ 大于 0.95 ,吸光度与质量浓度呈良好的线性关系。

1.3.9 氨基酸组成检测 参照国标 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》样品进行前处理,采用全自动氨基酸分析仪测定其组分。

1.3.10 生物利用率测定 模拟胃液和肠液的配制,采用 Minekus 等^[15]的方法。参照 Fang 等^[16]的方法并稍作修改,做模拟体外胃肠道消化试验。分别

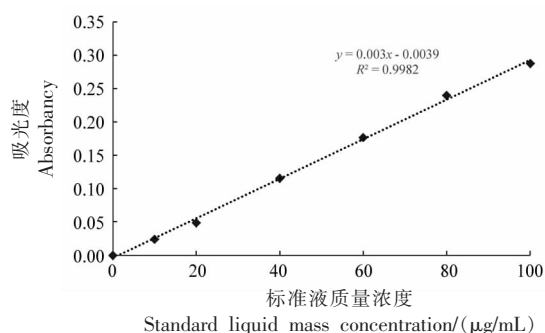


图 1 BSA 标准曲线

Fig.1 The standard curve of the BSA

取 10 mg/mL 的蛋白琥珀酸铁和三氯化铁 (对照) 溶液,加入模拟胃液 (体积比 $1:1$),用 1 mol/L 盐酸调节 pH 值至 2.0 ,将混合物在振荡培养箱中孵育 10 min ,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中振荡 2 h 后加入模拟肠液 (体积比 $1:1$),用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 7.5 ,将混合物装至到透析袋中 (5 ku), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 2 h , $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 时停止反应。

依次取胃液、肠液消化后的溶液 10000 r/min 离心 15 min ,测定上清液和溶液中铁离子含量;经肠液消化后,取透析袋外的溶液,测定铁离子含量来反映该液体中模拟肠道中的铁离子含量^[17]。采用 EDTA 络合滴定法测定铁离子的溶解率和透析率。

$$\text{铁离子溶解率}(\%) = V_1 / V_2 \times 100 \quad (5)$$

式中: V_1 为消耗上清液中铁离子所需要的 EDTA 溶液体积,mL; V_2 为消耗等体积溶液中铁离子所需要的 EDTA 溶液体积,mL。

$$\text{铁离子透析率}(\%) = V_a / V_b \times 100 \quad (6)$$

式中: V_a 为消耗透析袋外铁离子所需要的 EDTA 溶液体积,mL; V_b 为消耗透析袋内外铁离子所需要的 EDTA 溶液体积,mL。

1.3.11 数据统计分析 采用 SPSS 19.0 和 Design Expert 8.0.6 对单因素实验结果和响应面进行统计分析;采用 Origin 2018 对表征后的数据作图和分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果与分析

为了得到不同因素的最适条件,以酰化率为参考指标,其它条件保持一致,分别研究牦牛乳酪

蛋白与丁二酸酐投料比、丁二酸酐投入次数、pH值、反应温度和反应时间对牦牛乳酪蛋白酰化改性后酰化率的影响。最终得到牦牛乳酪蛋白与丁二酸酐投料比 2:1, 丁二酸酐分 5 次投入, pH=9, 反应温度为 45 ℃, 反应时间 50 min 时, 酰化率达最高值。

2.1.1 牦牛乳酪蛋白与丁二酸酐投料比 图 2a 显示牦牛乳酪蛋白与丁二酸酐投料比对酰化率的影响。可以看出, 酰化率随丁二酸酐用量的增加而增大。当牦牛乳酪蛋白与丁二酸酐质量比为 2:1 时, 酰化率为 85.77%; 当二者配比为 1:1 时, 酰化率为 85.98%, 较二者配比为 2:1 时高 0.21%, 增加幅度不大。在此阶段, 游离氨基酸基本完成了反应, 仅少量的氨基未被酰化, 被包裹在酪蛋白胶束中, 无法参与反应。由此可见, 反应物浓度增大导致化学反应程度增加, 配比增大, 酰化率增加; 继续增大配比, 由于位阻效应, 酰化率变化幅度小。考虑到原料成本等因素, 最终选择牦牛乳酪蛋白与琥珀酸酐最佳质量比为 2:1。

2.1.2 丁二酸酐投入次数 图 2b 显示丁二酸酐投入次数对酰化率的影响。随着投入次数的增加, 酰化率逐渐升高, 分 5 次加入时酰化率达到 85.56%。考虑到反应物的接触面积与化学反应效率存在一定的关系, 少量多次投入的酰化率高, 可能和丁二酸酐与酪蛋白接触面积有关。少量多次投入的丁二酸酐与酪蛋白溶液接触面积比一次性投入要大, 溶解度高, 因此反应更完全, 酰化率更高。本试验中, 丁二酸酐投入次数为 5 次时酰化率最高。考虑到实际操作等因素, 应结合具体投入量决定投入次数。

2.1.3 pH 值 图 2c 显示 pH 值对酰化率的影响。随着 pH 值升高, 酰化率先增大后减小, 这是因为在弱碱性条件下有利于发生酰胺化反应, 导致酪蛋白单体带负电荷, 静电排斥力增强, 单体解离度增加, 大量游离氨基暴露^[18], 增加了酪蛋白的结合位点。当 pH 值大于 9 后, 丁二酸酐发生水解后与碱反应中和, 导致体系中丁二酸酐浓度急剧下降, 影响酰化率。最适宜的反应 pH 值为 9。

2.1.4 反应温度 图 2d 显示反应温度对酰化率的影响。当反应温度 45 ℃ 时酰化率最高, 反应温度在 35 ℃ 到 40 ℃ 时, 酰化率上升较大, 40 ℃ 后酰化率变化幅度较小。当体系温度较低时, 丁二酸酐

的水解反应速度较缓慢, 酰化反应进行的缓慢, 因而酰化率不高。当温度升高时, 丁二酸酐的水解速度显著加快, 产生的酸容易导致酪蛋白沉淀, 这样反而不利于酰化反应的进行, 进而导致酰化率不高。此外, 高温下酪蛋白胶束容易聚集^[19], 选择 45 ℃ 为最佳反应温度。

2.1.5 反应时间 图 2e 显示反应时间对酰化率的影响。随着反应时间的延长, 酰化率先升高后降低, 50 min 时酰化率最高, 30 min 时酰化率最低且在此过程中酰化率增幅较大。在长时间高温处理的情况下, 酪蛋白出现聚集, 这导致一些暴露的氨基残基被隐藏在内部, 无法发生酰胺化反应, 酪蛋白酰化率低。若反应时间过短, 反应不完全, 酰化不彻底, 酰化率低。最佳反应时间为 50 min。

2.2 响应面优化结果与分析

2.2.1 响应面试验设计及结果 考虑到牦牛乳酪蛋白与丁二酸酐的投料比的反应本质是反应物浓度增加使反应程度增加, 丁二酸酐的投入次数与反应物接触面积有关, 均与反应条件的交互作用不大, 因此, 本研究固定投料比及投入次数, 选取 pH 值(A)、温度(B)、时间(C)为自变量, 酰化率(Y)为响应值, 设计 3 因素 3 水平共 17 组响应面优化试验, 具体设计及结果表 2。

2.2.2 二次回归模型的建立及显著性分析结果 用 Design Expert 8.0.6 软件对试验数据进行多元回归分析, 在此基础上建立酪蛋白酰化率与 pH 值、温度和时间之间的全变量二次多项式回归模型, 其方程为:

$$Y = 93.19 - 0.45A + 1.80B - 0.20C + 0.52AB - 0.26AC + 0.35BC - 1.52A^2 - 3.40B^2 - 1.98C^2$$

由表 3 方差回归模拟差分析可看出, 模型极显著($P < 0.01$), 失拟项不显著($P > 0.05$), 表明建立的模型较为合理。决定系数(R^2)为 0.9940, 校正系数(R^2_{Adj})为 0.9863, 该模型拟合表现良好, 自变量与响应变量间的线性关系显著, 可用此模型来分析及预测 pH 值、温度、时间对酪蛋白酰化率的影响。该模型中交互项 AB 对酰化率的影响程度显著($P < 0.05$), 一次项 A、一次项 B 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对酰化率影响极显著($P < 0.01$)。由 F 值可知, 各因素对酪蛋白酰化率影响顺序为温度(B) > pH 值(A) > 时间(C)。

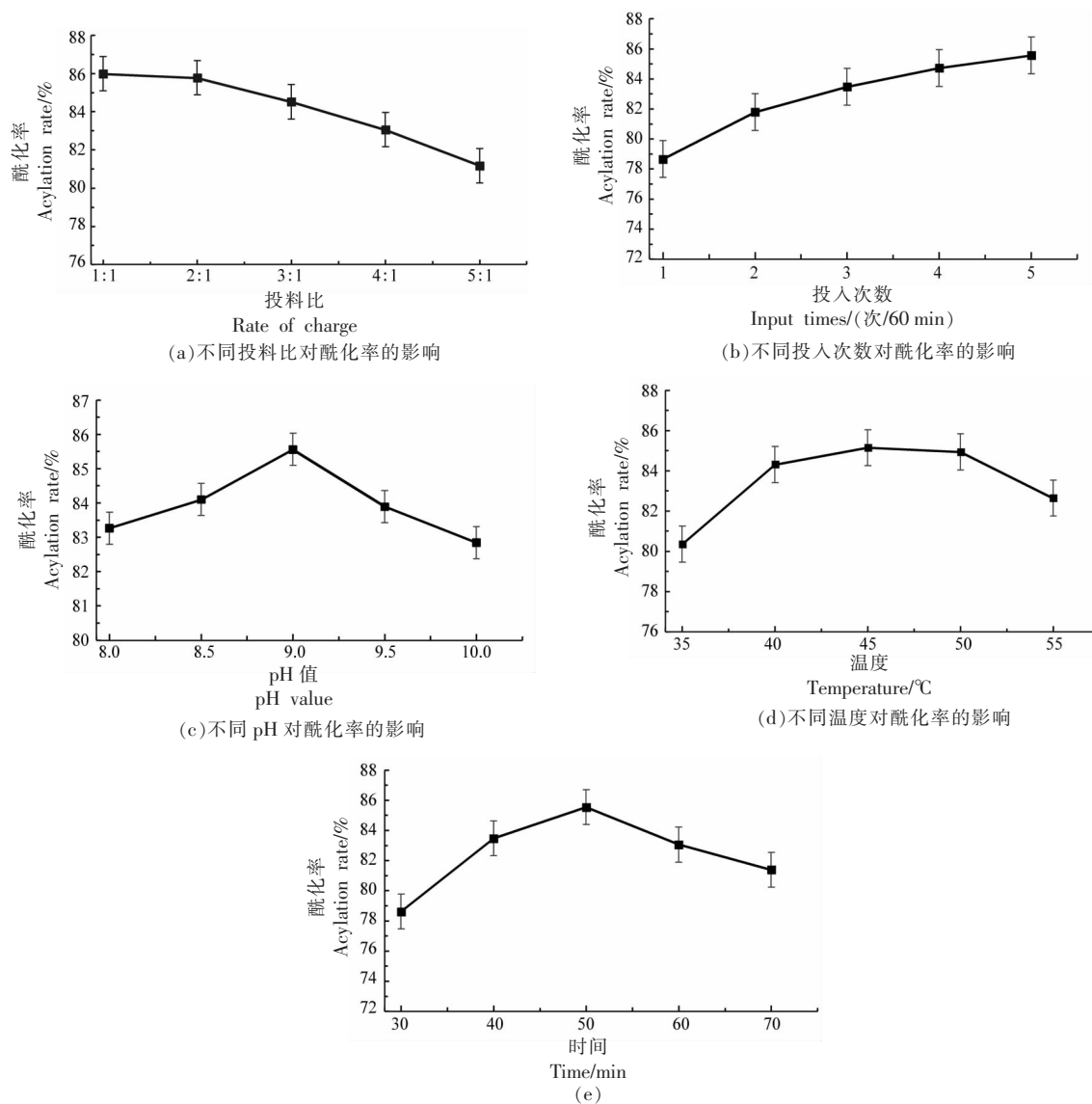


图 2 不同单因素条件对酰化率的影响

Fig.2 Effect of different single factor conditions on acylation rate

表 2 响应面设计及结果

Table 2 Response surface design and results

试验号	A	B	C	酰化率(Y)/%	试验号	A	B	C	酰化率(Y)/%
1	0	0	0	92.98	10	1	0	1	88.79
2	0	0	0	93.82	11	0	0	0	93.19
3	0	-1	-1	86.49	12	-1	1	0	89.84
4	0	0	0	92.98	13	1	1	0	90.05
5	0	-1	1	85.29	14	-1	-1	0	89.54
6	1	0	-1	89.63	15	0	0	0	92.98
7	0	1	-1	89.63	16	-1	0	1	90.26
8	1	-1	0	85.66	17	-1	0	-1	90.06
9	0	1	1	89.84					

表3 回归模型方差分析表

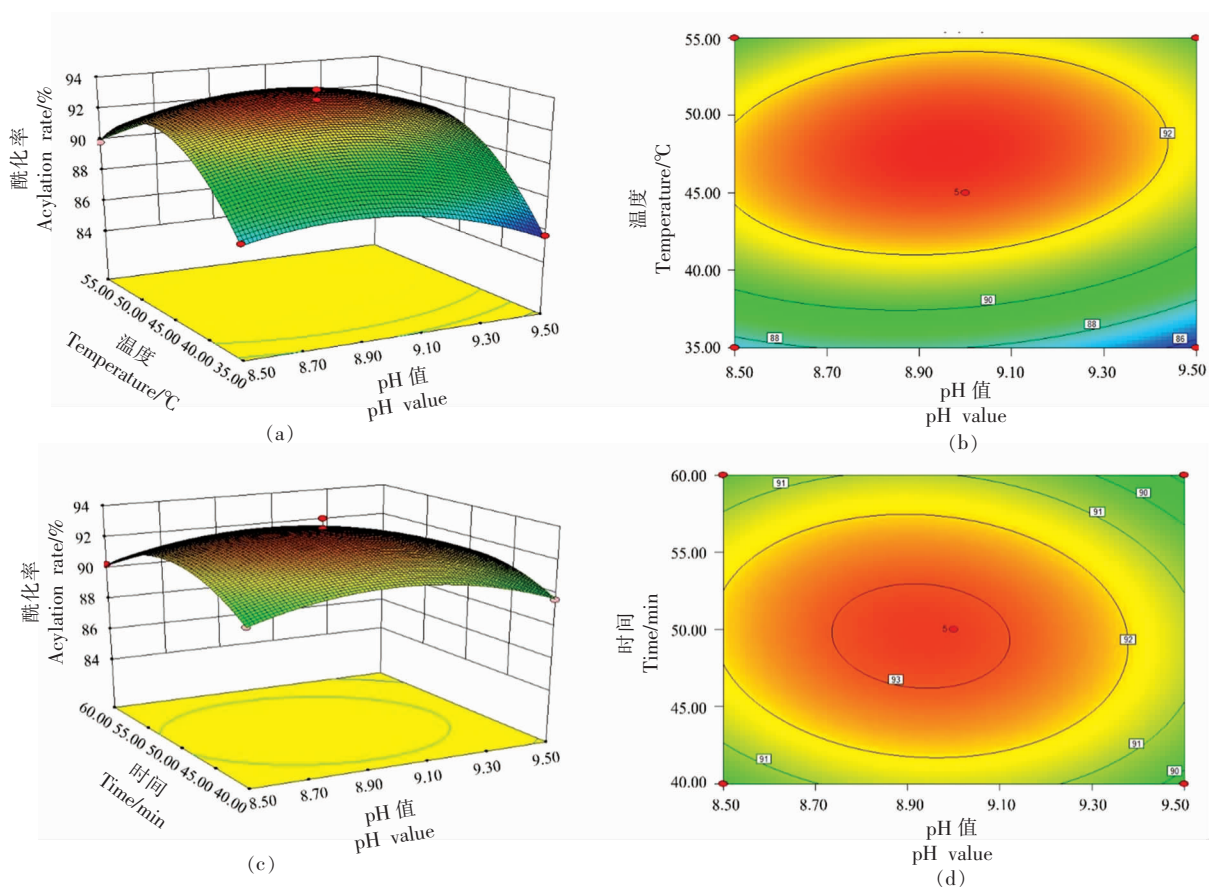
Table 3 Analysis of variance of regression model

因素	平方和	自由度	均方	F值	Pr>F	显著性
模型	111.93	9	12.44	128.76	< 0.0001	**
A	1.59	1	1.59	16.49	0.0048	**
B	25.85	1	25.85	267.61	< 0.0001	**
C	0.33	1	0.33	3.44	0.1061	
AB	1.09	1	1.09	11.31	0.0120	*
AC	0.27	1	0.27	2.80	0.1382	
BC	0.50	1	0.50	5.15	0.0576	
A ²	9.76	1	9.76	101.05	< 0.0001	**
B ²	48.53	1	48.53	502.44	< 0.0001	**
C ²	16.55	1	16.55	171.33	< 0.0001	**
残差	0.68	7	0.097			
失拟	0.15	3	0.049	0.37	0.7798	
误差	0.53	4	0.13			
总和	112.61	16				

注: **表示差异极显著($P < 0.01$); *表示差异显著($P < 0.05$); Pr表示概率值。

2.2.3 响应面分析结果 响应面越陡,坡度越大,说明该因素对酰化率影响越显著;等高线的形状反映交互作用的程度,当呈现椭圆形时,表示两个因素间的交互作用显著;当呈现圆形时,则代表交互作用较弱^[21]。由图4可得,交互项AB的曲面弧度较陡,且等高线呈现椭圆形,表明pH值(A)和温度(B)之间的相互作用对酰化率影响显著,这与方差分析结论一致。

交互作用较弱^[21]。由图4可得,交互项AB的曲面弧度较陡,且等高线呈现椭圆形,表明pH值(A)和温度(B)之间的相互作用对酰化率影响显著,这与方差分析结论一致。



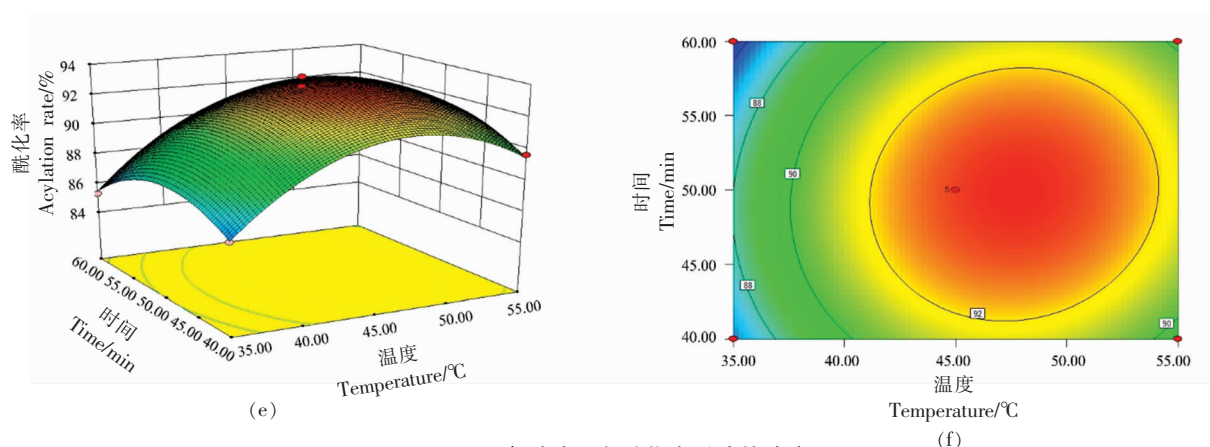


图 3 不同因素对酪蛋白酰化率影响的响应面图

Fig.3 Response surface diagram of the influence of different factors on casein acylation rate

2.2.4 响应面验证试验结果 用响应面寻优分析方法对回归模型进行分析,当牦牛乳酪蛋白与丁二酸酐投料比为 2:1,丁二酸酐的投入次数为 5 次/h, pH 8.95,反应温度 47.55 °C,反应时间 49.78 min,响应面有最优值,为 93.45%。结合实际情况,将各参数调整为 pH 9,反应温度 48 °C,反应时间 50 min。在此条件下重复试验 3 次,得酰化率平均值为 93.27%,与预测值相近,说明该模型可靠。

2.3 评价指标

经测定牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁含铁量为 8.00%,较张慧斌等^[10]制备的蛋白琥珀酸铁高 1.33%。据文献[4,13]报道,牦牛乳酪蛋白中氨基酸含量比普通牛乳高且反应性质不同,导致牦牛乳酪蛋白酰化程度高,铁离子螯合率和得率较高。

表 4 评价指标结果

Table 4 Evaluation index result	
指标	含量/%
含铁量	8.00
螯合率	93.03
得率	85.00

2.4 傅里叶红外光谱分析结果

如图 4 所示,对比牦牛乳酪蛋白与蛋白琥珀酸铁谱图,部分特征吸收峰发生明显的变化。在官能团区,3 276.21 cm^{-1} 表示酰胺 A 带的 N-H 和 O-H 伸缩振动,经螯合后移至 3 285.79 cm^{-1} 处,可推测酪蛋白在酰化过程中 N 端氨基和侧链氨基与

铁离子螯合形成 N-Fe^[22]。在指纹区,1 626.76, 1 515.36 cm^{-1} 处的吸收峰是由 C=O 和 C-N 伸缩振动引起的,在铁离子的作用下分别移至 1 635.94, 1 557.21 cm^{-1} 处,归因于酰胺键参与反应。在牦牛乳酪蛋白的 1 399.68 cm^{-1} 处观察到 -COOH 的伸缩振动,当与铁离子结合后,吸收峰位置向 1 400.51 cm^{-1} 移动,形成特征吸收峰。同时,在 1 071.72 cm^{-1} 处发现一个向低频移动并增强的吸收峰,这是由于 -NH₂ 基团的存在表明铁离子与 -NH₂ 之间发生结合,这与高敏等^[23]的研究结果相符。上述吸收峰的位置变化、新增以及消失表明羧基中的氧原子和氨基中的氮原子是发生螯合反应的主要配位原子^[24]。由此可推断牦牛乳酪蛋白经酰化后,与铁离子之间发生螯合反应,形成牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁螯合物。

2.5 粒径分布

如图 5 可知,螯合后相比螯合前粒径增加,这是由于酪蛋白酰化后与铁离子络合以及自身结合分子量增加,粒径变大所致,这与楼钰航^[25]的研究结果一致,表明形成牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁螯合物。

2.6 扫描电子显微镜结果

由图 6 可看出,酪蛋白表面不光滑且呈多孔状(图 6a)。蛋白琥珀酸铁较酪蛋白而言(图 6b),表面光滑,结构紧密,两者之间微观结构物的差异可能是由于酪蛋白经酰化改性,结合位点增加,铁离子通过配位键与其相互作用所致^[26],这与谿光慧等^[27]的研究结果相似。扫描电子显微镜表明铁

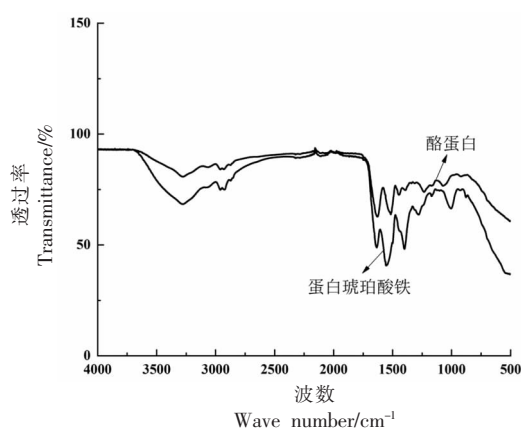


图4 傅里叶变换红外光谱图

Fig.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectrum

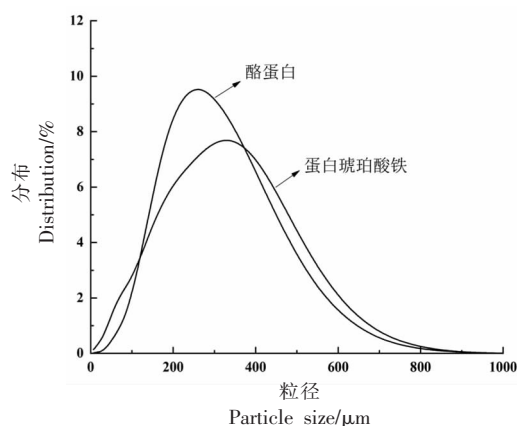


图5 酪蛋白及蛋白琥珀酸铁的粒径分布图谱

Fig.5 Particle size distribution of casein and ferric succinate

离子与酰化蛋白成功整合。

2.7 蛋白含量

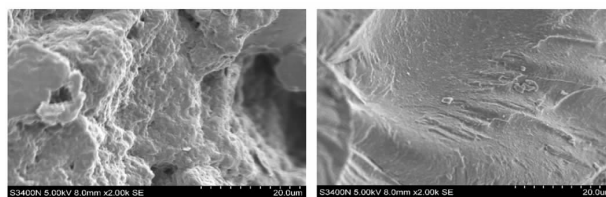
根据考马斯亮蓝法测定牦牛乳酪蛋白与蛋白琥珀酸铁蛋白含量,在 595 nm 处测吸光度。由标准曲线可得最终蛋白质含量(见表 5),由此可得整合后蛋白质损失 28.12%。

2.8 氨基酸组成

表 6 结果显示,牦牛乳酪中的蛋白质和琥珀酸铁中的蛋白质所含必需氨基酸比例分别为 41.33%和 41.10%。在整合前、后,这两种产品的必需氨基酸含量变化不大。酪蛋白整合前、后氨基酸含量有很大差异。整合反应后,氨基酸总含量由整合前的 85.73 g/100 g 降至 51.93 g/100 g。这一结果与 Lee 等^[28]的研究结果相似。同时酪蛋白与蛋白琥珀酸铁中 Glu、Asp 和 Pro 含量最高,其中 Glu 和 Asp 为带负电荷的极性氨基酸,其侧链基团均含有羧基等官能团,能够提供金属离子结合位点,有助于铁离子的整合^[29]。有研究^[30]显示,Glu 和 Asp 存在环状结构,能与金属离子形成稳定的螯合物,这两种氨基酸在其中起关键作用,与本试验结果相似。

2.9 生物利用率

由图 7、8 可知,牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁和三氯化铁经胃消化后的溶解率分别为 35.59%, 20.27%,其差异在统计学上极显著($P<0.01$)。经肠道消化后,它们的溶解率分别为 97.51%和 96.10%,其差异显著($P<0.05$)。透析率分别为



(a)酪蛋白

(b)蛋白琥珀酸铁

图6 扫描电子显微镜图

Fig.6 Scanning electron microscopy

表5 蛋白质含量测定结果

Table 5 Protein content determination results

样品	蛋白质含量/(nmol/mL)
牦牛乳酪蛋白	609.15
蛋白琥珀酸铁	437.85

46.01%和 34.63%,二者间的差异在统计学上极显著($P<0.01$)。酸性条件抑制三氯化铁水解,而在偏中性或碱性条件下促进牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁水解,因此其在肠道中溶解度高。由于其配位键稳定,蛋白琥珀酸铁在胃肠道中更加稳定,相对于无机盐来说具有更好的溶解性。铁离子与酰化蛋白结合后形成分子复合物,可通过透析袋分离,然而无机铁离子可能生成沉淀,使其无法通过透析膜。据文献^[31-32]报道,蛋白琥珀酸铁通过络合铁离子在酪蛋白分子结构中形成螯合物,其独特结构在胃内具有抗胃蛋白酶酶解的特性,同时铁离子被蛋白膜包裹,有效保护了胃黏膜。由于保留了酪蛋白对酸碱度敏感的特性,具有肠道靶向性,进入

表6 氨基酸组成(g/100g)

Table 6 Amino acid composition (g/100 g)		
氨基酸种类	牦牛乳酪蛋白	蛋白琥珀酸铁
Lys*	6.86	3.55
Asp	6.24	4.3
Tyr*	4.73	2.88
Val*	4.85	3.23
Met*	2.52	1.62
Leu*	8.84	5.37
Thr	3.79	1.82
Cys	0.43	0.29
Ser	4.76	1.14
Lle*	4.15	2.66
His	2.28	0.86
Glu	17.6	11.7
Phe*	4.43	3.11
Arg	2.93	1.39
Ala	2.79	2.24
Pro	6.92	4.71
Gly	1.61	1.09
总氨基酸	85.73	51.96

注:*表示必需氨基酸。

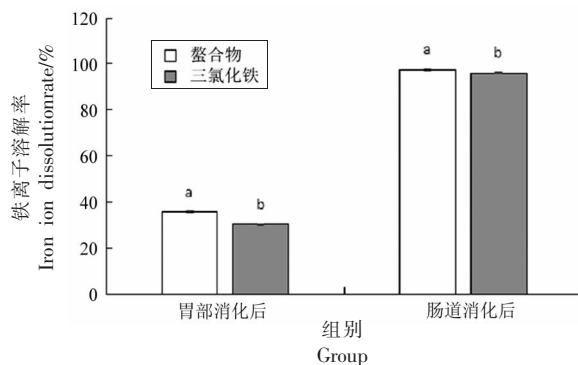
肠道后蛋白膜被胰蛋白酶水解,释放出铁离子,有助于机体生理吸收,呈现平稳吸收趋势,逐步实现人体各部位吸收与贮存的最佳动态平衡状态,因此对胃肠道具有很强的耐受性,具有较高的利用价值。体外消化试验证明牦牛乳酪中蛋白琥珀酸铁的生物利用率较无机盐高,证实该复合物不容易被胃蛋白酶降解,在进入肠道时可被胰蛋白酶水解^[4]。

3 结论

以牦牛乳酪蛋白为原料,优化牦牛乳酪蛋白酰化工艺,制备高质量、生物利用度好的蛋白琥珀酸铁,牦牛乳蛋白酰化率达93.27%。这表明形成牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁螯合物,其结构紧密,表面光滑,Glu和Asp对螯合反应起重要作用,具有较好的生物利用率。

参 考 文 献

[1] 张金亮,李义恒,杨晓丽,等.内源性LPL及其对



注:同组不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

图7 体外模拟消化中铁离子溶解率的比较
Fig.7 Comparison of iron dissolution rates in vitro simulated digestion

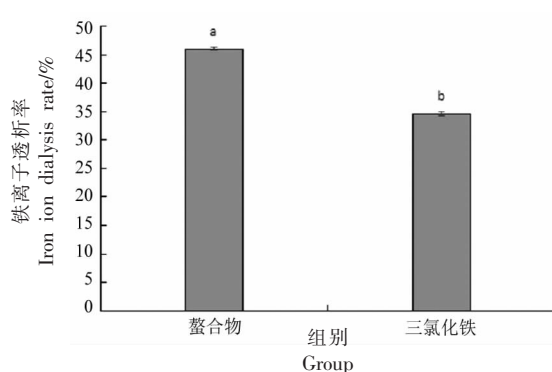


图8 体外模拟消化中铁离子透析率的比较

Fig.8 Comparison of iron ion dialysis rates in vitro simulated digestion

牦牛乳风味劣变的影响机制研究进展[J].食品与发酵工业,2023,49(3):347-353.

ZHANG J L, LI Y H, YANG X L, et al. Research progress of endogenous LPL and its influence mechanism on yak milk flavor deterioration[J]. Food and Fermentation Industry, 2023, 49(3): 347-353.

[2] 吴登宇,韦体,马忠仁,等.牦牛乳酪蛋白抗氧化肽对HEK293细胞氧化应激损伤的保护作用[J].食品科学,2023,44(23):142-150.

WU D Y, WEI T, MA Z R, et al. Protective effects of yak cheese protein antioxidant peptides on oxidative stress injury of HEK293 cells[J]. Food Science, 2023, 44(23): 142-150.

[3] LIU Q X, YANG M, ZHAO B T, et al. Isolation of antioxidant peptides from yak casein hydrolysate [J]. RSC Advances, 2020, 10(34): 19844-19851.

[4] 钟丽雯,鲁迎瑞,张卫兵,等.补铁剂及多肽铁复合

- 物的研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(4): 63-69.
- ZHONG L W, LU Y R, ZHANG W B, et al. Research progress of iron supplement and polypeptide iron complex [J]. Dairy Science and Technology, 2022, 45(4): 63-69.
- [5] MU Q D, CHEN L Y, GAO X T, et al. The role of iron homeostasis in remodeling immune function and regulating inflammatory disease (review)[J]. Science Bulletin, 2021, 66(17): 1806-1816.
- [6] 孙晓琦, 武天琦, 李璐. 锌、铁、铜、锰微量元素与老年人常见疾病的关系[J]. 现代食品, 2018(18): 43-45.
- SUN X Q, WU T Q, LI L. Relationship between trace elements of zinc, iron, copper and manganese and common diseases in elderly people[J]. Modern Food, 2018(18): 43-45.
- [7] 邹文昊天. 大豆肽锌和大豆肽亚铁螯合物的制备及其特性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- ZHOU W H T. Preparation and characterization of soybean peptide zinc and soybean peptide ferrous chelates[D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.
- [8] CAETANO-SILVA M E, NETTO F M, BERTOLDO-PACHECO M T, et al. Peptide-metal complexes: Obtention and role in increasing bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 6(1): 1-20.
- [9] 漆腾飞. 蛋白琥珀酸铁口服溶液治疗小儿缺铁性贫血的临床疗效及其安全性[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(27): 127-129.
- QI T F. Clinical efficacy and safety of oral solution of protein iron succinate in the treatment of children with iron deficiency anemia[J]. Journal of Clinical Rational Drug Use, 2021, 14(27): 127-129.
- [10] 张慧斌. 蛋白琥珀酸铁原料及口服溶液的制备工艺研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- ZHANG H B. Study on preparation technology of Ferric succinate raw material and oral Solution[D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [11] SHILPASHREE B G, ARORA S, SHARMA V, et al. Preparation of iron bound succinylated milk protein concentrate and evaluation of its stability [J]. Food Chemistry, 2016, 196(1): 800-807.
- [12] SHILPASHREE B G, ARORA S, SHARMA V, et al. Preparation of succinylated sodium caseinate-iron complex by adopting ultrafiltration technology: A novel food fortificant[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2015, 32(12): 165-171.
- [13] 杨敏, 梁琪, 杨继涛, 等. 牦牛乳酪蛋白胶束琥珀酰化修饰研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(15): 200-204.
- YANG M, LIANG Q, YANG J T, et al. Study on the modification of yak cheese protein micellar succinylation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(15): 200-204.
- [14] 蒋大程, 高珊, 高海伦, 等. 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量中的细节问题[J]. 实验科学与技术, 2018, 16(4): 143-147.
- JANG D C, GAO S, GAO H L, et al. Details in the determination of protein content by Coomassie brilliant blue method [J]. Experiment Science and Technology, 2018, 16(4): 143-147.
- [15] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus[J]. Food & Function, 2014, 5(6): 1113-1124.
- [16] FANG S X, RUAN G R, JING H, et al. Characterization and antioxidant properties of Manchurian walnut meal hydrolysates after calcium chelation[J]. LWT, 2020, 130(20): 109632.
- [17] 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.
- FU T X, ZHANG S, SHENG Y N, et al. Preparation structure and *in vitro* digestion of zinc chelate from Mung bean[J]. Food Science, 2020, 41(4): 59-66.
- [18] LIU Y, GUO R. pH-dependent structures and properties of casein micelles[J]. Biophysical Chemistry, 2008, 136(2/3): 67-73.
- [19] 刘要卫. 牛乳粉加工过程中低丰度蛋白组分损失与控制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- LIU Y W. Research on the loss and control of low abundance protein components in the processing of bovine milk powder[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [20] 宋朝阳, 汪月, 杨晓丽, 等. 温度对黄粉虫凝乳酶凝乳特性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 81-88.
- SONG Z Y, WANG Y, YANG X L, et al. Effect of temperature on rennet characteristics of Mealworm

- [J]. Food Science, 2022, 43(8): 81-88.
- [21] 刘静波, 王子秦, 于一丁, 等. 响应面法优化豆粕肽制备工艺[J]. 中国食品学报, 2021, 21(8): 216-223.
- LIU J B, WANG Z Q, YU Y D, et al. Optimization of preparation process of soybean meal peptide by response surface method[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science of Technology, 2021, 21(8): 216-223.
- [22] 周小敏, 郑万源, 李澄. 金枪鱼骨胶原多肽螯合钙的制备[J]. 食品工业, 2020, 41(7): 22-26.
- ZHOU X M, ZHENG W Y, LI C. Preparation of tuna bone collagen polypeptide chelate calcium[J]. Food Industry, 2020, 41(7): 22-26.
- [23] 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.
- GAO M, WANG J M, ZHEN L H, et al. Preparation and structural characterization of bovine polypeptide chelates[J]. Food Science, 2020, 41(8): 256-261.
- [24] 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 Z, QIN Z B, ZHAO Y, et al. Preparation and characterization of silver carp collagen peptide-iron chelate[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 187-195.
- [25] 楼钰航. 延边黄牛骨多肽矿物质螯合物结构表征及抗氧化作用[D]. 延吉: 延边大学, 2021.
- LOU Y H. Structural characterization and antioxidant activity of polypeptide mineral chelates from Yanbian yellow cattle bone[D]. Yanji: Yanbian University, 2021.
- [26] WU W M, HE L C, LIANG Y H, et al. Preparation process optimization of pig bone collagen peptide-calcium chelate using response surface methodology and its structural characterization and stability analysis[J]. Food Chemistry, 2019, 284(30): 80-89.
- [27] 遼光慧, 布冠好, 王美月, 等. 花生肽亚铁螯合物的制备工艺优化及结构特性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(12): 3754-3761.
- TI G H, BU G H, WANG M Y, et al. Study on preparation and structure characteristics of ferrous peptide chelates from peanut[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2022, 13(12): 3754-3761.
- [28] LEE S H, SONG K B. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(3): 378-381.
- [29] 杨静, 石景, 邹焯, 等. 鸡血多肽亚铁螯合物的制备工艺优化及结构表征[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(6): 1678-1685.
- YANG J, SHI J, ZOU Y, et al. Preparation and characterization of polypeptide ferrous chelate in chicken blood[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2022, 38(6): 1678-1685.
- [30] WU W F, LI B F, HOU H, et al. Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35(17): 418-427.
- [31] WU W F, YANG Y 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(7): 108976.1-108976.7.
- [32] 苏雁, 方拥军, 何丽雅, 等. 蛋白琥珀酸铁口服溶液与富马酸亚铁混悬液治疗小儿缺铁性贫血的疗效观察[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2020, 25(4): 200-205.
- SU Y, FANG Y J, HE L Y, et al. Effect of oral solution of ferric succinate and suspension of ferric fumarate on children with iron deficiency anemia[J]. Chinese Journal of Pediatric Hematology and Oncology, 2020, 25(4): 200-205.

Preparation and Structural Characterization of Ferric Succinate from Yak Cheese Protein

Zhong Liwen¹, Lu Yingrui^{1,3}, Zhang Yixuan², Zhang Weibing¹, Shao Weiping¹, Guo Zhaobin¹, Wen Pengcheng^{1*}

(¹College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070

²Gansu Liaoyuan Dairy Co., Ltd., Gannan 747000, Gansu

³Wuwei Plateau Biological Products Co., Ltd., Wuwei 733000, Gansu)

Abstract In order to make full use of yak milk resources, using yak milk casein as the raw material, the response surface analysis method was adopted to determine the optimal acylation conditions of yak milk casein and prepare high-quality and good bioavailability ferrous succinylprotein products. The structure of the products was characterized by means of Fourier transform infrared spectroscopy, particle size distribution, scanning electron microscopy, amino acid composition, and *in vitro* simulated digestion. The results showed that the optimal acylation process parameters of yak milk casein were as follows: The mass ratio of casein to succinic anhydride was 2:1, succinic anhydride was added five times, pH value was 9, the reaction temperature was 48 °C, the reaction time was 50 min. Under these conditions, the acylation rate reached 93.27%, the iron content was 8%, and the chelation rate was 93.03%. The determination results of Fourier transform infrared spectroscopy showed that there were differences in the absorption peaks between ferrous succinylprotein and casein, and the iron ions in the acylated protein formed coordination bonds with carboxyl groups and amino groups. The particle size of ferrous succinylprotein was measured to be larger by the laser particle size distribution analyzer, confirming the formation of the chelate. The analysis by scanning electron microscope indicated that the surface of the sample was smooth and the structure was compact. By determining the protein content and amino acid composition of ferrous succinylprotein, the results showed that the protein loss of ferrous succinylprotein compared to casein was 28.12%. Among them, Glu, Asp, and Pro had the higher contents in casein and ferrous succinylprotein. Glu and Asp were the key amino acids for forming chelates, and the bioavailability was better than that of inorganic salts. The results of this study can provide a reference for the preparation and structural characterization of ferrous succinylprotein.

Keywords yak milk casein; iron protein succinate; iron supplements; acylation modification; structural characterization