

响应面法优化菌草灵芝多肽-硒螯合物的制备工艺

赵立娜¹, 陈紫红², 陈 濠², 花朋朋², 刘 斌^{1,2,*}

(1. 国家菌草工程技术研究中心, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002)

摘 要: 采用响应面分析法优化菌草灵芝多肽-硒螯合物的制备工艺, 以螯合物中硒含量为指标, 考察亚硒酸钠溶液与多肽溶液体积比、反应温度、反应时间和pH值对螯合反应的影响, 同时建立螯合物制备工艺的二次项数学模型并验证其可靠性, 并利用红外光谱法对菌草灵芝多肽-硒螯合物进行表征。结果表明: 影响菌草灵芝多肽与硒离子螯合的因素主次顺序为pH值>反应温度>体积比>反应时间, 最佳的螯合工艺条件为反应时间60 min、反应温度75 ℃、pH 9、亚硒酸钠溶液与多肽溶液体积比1:2, 最佳制备工艺条件下, 螯合物中硒含量为 $(2\,985.89 \pm 10.59) \mu\text{g/g}$ 。采用红外光谱法对螯合物进行表征, 表明所得物质为菌草灵芝多肽与硒的螯合物。本研究为合成有机硒化合物提供了一种新的原料, 也为菌草灵芝的开发利用提供了一个新的思路。

关键词: 菌草灵芝多肽; 螯合物; 响应面法; 菌草灵芝多肽-硒螯合物

Optimization of Chelation of Juncao *Ganoderma lucidum* Peptides with Selenium by Response Surface Methodology

ZHAO Lina¹, CHEN Zihong², CHEN Hao², HUA Pengpeng², LIU Bin^{1,2,*}

(1. China National Engineering Research Center of Juncao Technology, Fuzhou 350002, China;

2. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The purpose of the present study was to optimize the preparation of Juncao *Ganoderma lucidum* peptide-selenium chelate using response surface methodology. The independent variables were pH, the ratio of sodium selenite solution to protein hydrolysate (*V/V*), reaction time, and temperature. The response was selenium content. A quadratic polynomial regression model was established and its reliability was validated. The chelate was characterized by infrared (IR) spectroscopy. The results showed that in decreasing order significance, pH, reaction temperature, the ratio of sodium selenite solution to protein hydrolysate and reaction time affected the selenium content of chelates, and the optimal values of these factors were 9, 75 ℃, 1:2 and 60 min, respectively. The selenium content of the obtained product was $(2\,985.89 \pm 10.59) \mu\text{g/g}$. IR spectral analysis confirmed the chelation reaction between Juncao *Ganoderma lucidum* peptides and selenium ions and the generation of a new chelate. This study can provide a new approach for the development and utilization of Juncao *Ganoderma lucidum*.

Key words: Juncao *Ganoderma lucidum* peptide; chelation; response surface methodology; peptide-selenium chelate

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714029

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 14-0187-06

引文格式:

赵立娜, 陈紫红, 陈濠, 等. 响应面法优化菌草灵芝多肽-硒螯合物的制备工艺[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 187-192.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714029. <http://www.spkx.net.cn>

ZHAO Lina, CHEN Zihong, CHEN Hao, et al. Optimization of chelation of Juncao *Ganoderma lucidum* peptides with selenium by response surface methodology[J]. Food Science, 2017, 38(14): 187-192. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714029. <http://www.spkx.net.cn>

灵芝属 (*Ganoderma*) 真菌属于多孔菌科 (Polyporaceae) 药食兼用菌, 全世界共有108种^[1-2]。菌

草灵芝是用菌草代替木屑栽培出来的, 其药用价值比单纯用木屑栽培出的灵芝要高得多, 其多肽所含的必需氨

收稿日期: 2016-10-08

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31501432); 福建省科技重大专项 (2014NZ2002-1);

“十二五”国家科技支撑计划项目 (2014BAD15B01); 福建农林大学杰出青年项目 (xjq201608);

福建省科学技术厅高校产学研合作项目 (2017N5003)

作者简介: 赵立娜 (1984—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zln20002000@163.com

*通信作者: 刘斌 (1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: liubin618@hotmail.com

基酸丰富,营养价值高,易于被人体吸收,同时菌草灵芝多肽具有降血脂、降血压、抗氧化、调节免疫力、抗肿瘤等功效^[3-5]。硒是维持生物体机能包括生长、发育、繁衍等不可或缺的一类物质,虽然人体对硒的需求量极少,但是对生物体的生理健康和有关生理疾病的预防都与之密不可分。人体缺硒能造成体内重要器官的功能失调,还会使得糖尿病、肿瘤、心血管疾病、白内障、克山病等疾病的发病率提高^[6-8]。由于人工合成的有机硒化合物的生物安全性明显高于人工合成或天然的无机硒化物,甚至有些功能活性优于无机硒^[9]。因此,具有较高生物活性和较低毒副作用的有机硒化合物具有更广阔的发展空间。

目前国内外关于各种肽源与Fe、Zn、Ca等矿物质离子螯合制备矿物质螯合物的研究较多^[10-12],而以菌草灵芝为原料制备多肽-硒螯合物的研究鲜有报道。本研究利用菌草灵芝蛋白水解后的菌草灵芝多肽与硒螯合,优化菌草灵芝多肽硒螯合物的工艺条件,制备菌草灵芝多肽-硒螯合物,可充分发挥多肽和矿质元素对人体的双重营养功能特性,为菌草灵芝开发和应用提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌草灵芝 江西井冈山井祥菌草生态科技股份有限公司。

复合蛋白酶NS37119 诺维信(中国)生物技术有限公司;亚硒酸钠、无水乙醇、氢氧化钠等所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1600型紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;KDC-40低速离心机 科大创新股份有限公司中佳分公司;J-251型高速离心机 美国Beckman公司;循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;FE20型精密pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;FD-3冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌草灵芝多肽的制备

菌草灵芝→粉碎→蒸馏水溶解(料液比1:50)→调pH 11.0→60℃水浴1.5 h→6层纱布过滤→取上清液→抽滤→调pH 2.5→4 500 r/min离心→沉淀冷冻干燥→灵芝蛋白→配成底物质量分数3%→调pH 10.0→复合蛋白酶酶解(温度50℃、酶/底物6 000 U/g)→50℃水浴1 h→沸水浴10 min灭酶→4 500 r/min离心10 min→上清液(菌草灵芝多肽溶液)

1.3.2 菌草灵芝肽-硒螯合物的制备

取一定量灵芝多肽溶液(取3次平行),加入一

定体积比例的0.5 mol/L的亚硒酸钠溶液,充分搅拌,待pH值调节到一定值后,将其放置于一定温度的水浴摇床中充分反应一段时间,反应后置于室温冷却,在4 500 r/min、10 min的条件下离心取上清液,加入5倍体积的95%乙醇溶液,静置沉淀12 h,4 500 r/min、10 min离心取沉淀,用无水乙醇对沉淀物洗涤数次,将其置于烘箱中进行低温干燥处理使无水乙醇挥发,后进行冻干获得多肽-硒螯合物粉末。

1.3.3 螯合条件单因素试验

1.3.3.1 体积比(亚硒酸钠溶液-多肽溶液)对螯合物中的硒含量的影响

体积比分别为1:6、1:3、1:2、2:3、5:6,取菌草灵芝多肽溶液2 mL,反应温度80℃,pH 8.0,反应时间120 min。

1.3.3.2 反应温度对螯合物中硒含量的影响

反应温度分别为30、40、50、60、70、80℃条件下,取菌草灵芝多肽溶液2 mL,亚硒酸钠和多肽溶液体积比为1:2,pH 8.0,反应时间120 min。

1.3.3.3 反应时间对螯合物中硒含量的影响

反应时间分别取10、20、30、60、90、120 min,取菌草灵芝多肽溶液2 mL,亚硒酸钠和多肽溶液体积比为1:2,pH 8.0,反应温度60℃。

1.3.3.4 pH值对螯合物中硒含量的影响

pH值分别取4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,取菌草灵芝多肽溶液2 mL,亚硒酸钠和多肽溶液体积比为1:2,反应温度60℃,反应时间60 min。

1.3.4 响应面试验

根据单因素试验结果,以硒含量为指标,对pH值、反应时间、反应温度和体积比这4个因素进行响应面优化,因素与水平设计见表1,试验重复3次。

表1 响应面试验因素与水平
Table 1 Factors and their levels used in response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A反应温度/℃	50	65	80
B pH	7	8	9
C反应时间/min	20	40	60
D体积比	1:3	1:2	2:3

1.3.5 硒含量的测定

采用3,3'-二氨基联苯胺比色法^[13]测定硒含量,计算如下式所示:

$$\text{硒含量}/(\mu\text{g/g}) = \frac{pV}{mN}$$

式中: p 为从标准曲线中查得相当于硒的标准质量浓度/ $\mu\text{g/mL}$; V 为甲苯萃取所得的样品体积/ mL ; m 为样品的质量/ g ; N 为用于测定的样品体积占总定容后样品的体积分数/%。

1.3.6 红外光谱测定

菌草灵芝多肽与菌草灵芝多肽-硒螯合物的红外光谱图的测定采用KBr压片法^[14]。取固体样品1 mg和干燥后的KBr 100 mg, 放入玛瑙研钵中混合研磨, 研磨至粒度在2.5~2.0 μm以下; 装入压片装置中, 加压至20 MPa, 维持1~2 min; 取出压片, 呈半透明状, 利用傅里叶变换红外光谱仪进行定性分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 亚硒酸钠与多肽溶液体积比对螯合物中硒含量的影响

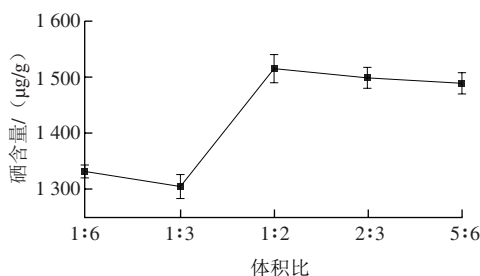


图1 体积比对硒含量的影响

Fig. 1 Effect of the ratio of sodium selenite to peptides on selenium content

由图1可知, 当亚硒酸钠溶液与多肽溶液体积比为1:2时, 硒含量达到最高值, 继续添加亚硒酸钠溶液, 螯合物中的硒含量逐渐趋于平衡。由此可见, 亚硒酸钠溶液与菌草灵芝多肽溶液体积比对螯合物中硒含量影响较大, 当亚硒酸钠溶液的添加量较小时, 螯合物的硒含量较低, 可能是因为此时的硒离子含量较少, 多肽过量, 使得部分多肽无法与硒离子形成稳定结构。最终选择亚硒酸钠溶液与多肽溶液体积比1:2。

2.1.2 反应温度对螯合物中硒含量的影响

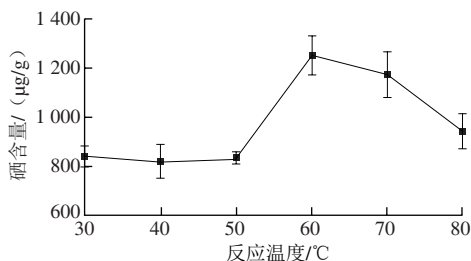


图2 反应温度对硒含量的影响

Fig. 2 Effect of reaction temperature on selenium content

由图2可知, 温度对螯合反应有一定的影响, 螯合温度到达60℃时硒含量最高, 再继续升高温度硒含量略微降低。此结果与张晓霞^[15]、毛学英^[16]等的结论类似, 温度过高可能会使氨基酸或者小肽发生羧基反应, 与硒离子形成竞争, 导致螯合能力降低, 温度过低会使螯合反应速率变慢^[17]。

2.1.3 反应时间对螯合物中硒含量的影响

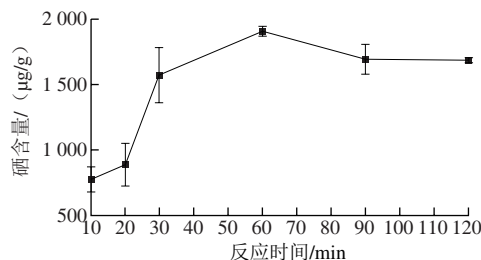


图3 反应时间对硒含量的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on selenium content

由图3可知, 反应时间为10~60 min时, 螯合物中的硒含量随反应时间的延长而快速增高, 当达至60 min时螯合物中硒含量达到最高。但是, 当反应时间再延长时, 硒含量却有略微下降, 之后趋于稳定。此结果与马利华^[18]和金文刚^[19]等研究结果一致, 螯合时间过长反而不利于螯合反应的进行, 易导致螯合物的结构变得不稳定, 阻碍了螯合反应的进行, 从而使得硒螯合能力有所降低。

2.1.4 pH值对螯合物中硒含量的影响

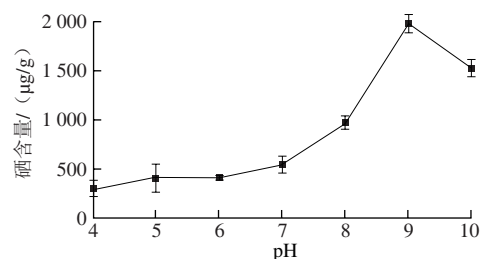


图4 pH值对硒含量的影响

Fig. 4 Effect of pH on selenium content

由图4可知, 反应在酸性条件下进行时, 螯合物中的硒含量较低。这可能是由于H⁺与硒离子竞争供电子基团^[20], 阻碍了菌草灵芝多肽-硒螯合物的生成。当pH值在4.0~9.0之间时, 随着pH值的不断升高, 硒螯合能力快速提升, 在pH 9.0时硒含量达到最高, 但当pH值超过9.0后硒含量反而下降, 可能是因为在强碱条件下发生了一系列的副反应, 导致硒含量降低^[21]。

2.2 螯合条件响应面试验结果

2.2.1 数学模型的建立及显著性检验

如表2所示, 以菌草灵芝多肽-硒螯合物的硒含量为响应值, 采用Design-Expert回归分析软件分析表2中29个试验点的响应值, 经软件综合分析后, 各试验因素对菌草灵芝多肽-硒螯合物的硒含量的影响可采用如下回归方程表示:

$$\begin{aligned} \text{硒含量}/(\mu\text{g/g}) = & 2\,487.84 + 419.73A + 531.81B + \\ & 205.44C + 230.46D + 193.87AB - 205.60AC - 62.59AD + \\ & 385.68BC + 43.83BD - 104.99CD - 262.45A^2 - 481.08B^2 - \\ & 222.15C^2 - 438.21D^2 \end{aligned}$$

表2 响应面试验设计和结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A反应温度/℃	B pH	C反应时间/min	D体积比	硒含量/(μg/g)
1	50	8	20	1:2	1 071.47
2	80	7	40	1:2	1 384.37
3	50	8	60	1:2	1 986.13
4	65	9	40	2:3	2 758.94
5	50	9	40	1:2	1 474.44
6	50	8	40	1:3	1 299.29
7	50	8	40	2:3	1 747.44
8	65	9	40	1:3	1 821.91
9	65	7	40	1:3	6 50.79
10	65	8	60	2:3	1 959.27
11	65	8	20	2:3	1 664.01
12	80	9	40	1:2	2 661.97
13	65	8	60	1:3	1 958.85
14	65	8	20	1:3	1 243.62
15	65	8	40	1:2	2 528.51
16	50	7	40	1:2	972.30
17	80	8	60	1:2	2 708.80
18	65	7	40	2:3	1 412.51
19	80	8	40	2:3	2 206.98
20	65	7	20	1:2	1 565.79
21	65	8	40	1:2	2 378.68
22	65	9	20	1:2	1 836.62
23	80	8	40	1:3	2 009.18
24	80	8	20	1:2	2 616.52
25	65	8	40	1:2	2 665.81
26	65	8	40	1:2	2 478.46
27	65	9	60	1:2	2 831.89
28	65	8	40	1:2	2 387.74
29	65	7	60	1:2	1 018.34

表3 响应面二次模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of quadratic response surface model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.01×10^7	14	7.19×10^5	13.34	<0.000 1
A反应温度	2.11×10^6	1	2.11×10^6	39.23	<0.000 1
B pH值	3.39×10^6	1	3.39×10^6	62.97	<0.000 1
C反应时间	5.07×10^5	1	5.07×10^5	9.4	0.008 4
D体积比	6.37×10^5	1	6.37×10^5	11.83	0.004 0
AB	1.50×10^5	1	1.50×10^5	2.79	0.117 1
AC	1.69×10^5	1	1.69×10^5	3.14	0.098 3
AD	15 668.78	1	15 668.78	0.29	0.598 2
BC	5.95×10^5	1	5.95×10^5	11.04	0.005 0
BD	7 683.4	1	7 683.4	0.14	0.711 4
CD	44 093.7	1	44 093.7	0.82	0.381 0
A ²	4.47×10^5	1	4.47×10^5	8.29	0.012 1
B ²	1.50×10^5	1	1.50×10^6	27.86	0.000 1
C ²	3.20×10^5	1	3.20×10^5	5.94	0.028 7
D ²	1.25×10^6	1	1.25×10^6	23.11	0.000 3
残差	7.55×10^5	14	53 893.14		
失拟项	6.99×10^5	10	69 915.27	5.05	0.066 2
净误差	55 351.27	4	13 837.82		
校正项	1.08×10^7	28			

注: $P < 0.05$, 影响显著。

回归方程的方差分析结果见表3。对菌草灵芝多肽-硒螯合物的硒含量而言, 其因变量和全体自变量之间存在

在显著的线性关系, $R^2=0.930\ 3$, 说明该方程是高度显著的, 其中响应值的改变有93.03%源自于所选变量, 即体积比、pH值、反应温度、反应时间, 因此该回归方程的拟合性较好, 所建模型是可行的。由表3可知, A、B、C、D、BC、A²、B²、C²、D²项都对响应值有显著的影响, 其影响强弱的排序为: pH值>反应温度>体积比>反应时间。通过对该回归方程中的各项方差进行分析得出以下结论: 从一次项角度可以看出pH值和反应温度是影响菌草灵芝多肽-硒螯合物硒含量的主要因素; 对于二次项除BC外都是由单因素中的显著因素变成不显著因素, 进而表明了各试验因素与该响应值之间的影响是由于其复杂的线性关系。因此, 可以利用该回归方程确定最佳螯合工艺条件是可行的。

2.2.2 响应面试验分析及对菌草灵芝多肽-螯合物的优化

通过Design-Expert软件综合分析得出所需的回归方程, 让各因素保持不变, 只对回归模型进行降维处理, 从而考察各因素间的交互作用对菌草灵芝多肽-硒螯合物硒含量产生的影响。通过对回归分析结果数据处理, 作出响应面和等高线图, 如图5所示。响应值出现最大值, 各参数间的等高线呈椭圆形, 具有显著的相互作用关系, 并且通过响应面图能够观察到最高点^[22-23]。说明pH值和反应时间之间存在着显著的相互作用。

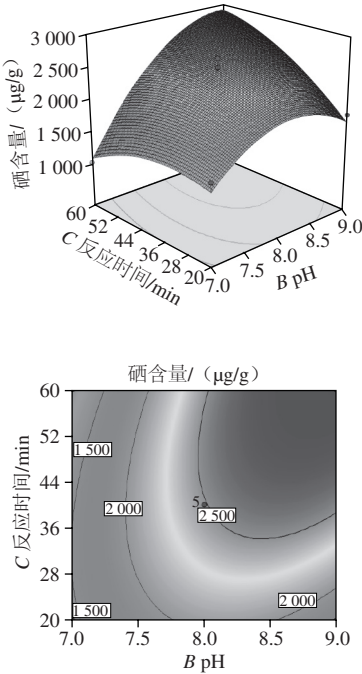


图5 反应时间和pH值交互作用对硒含量影响的响应面图
Fig. 5 Response surface plot showing the effect of reaction time and pH of selenium content

利用Design-Expert软件由所建的数学模型进行参数最优分析,得出菌草灵芝多肽-硒螯合物的硒含量最高参数条件为:反应时间58.62 min、反应温度76.78 ℃、pH 9、体积比3.15:6。此优化工艺下硒含量的预测值为3 075.29 $\mu\text{g/g}$,为适合实验操作,调整条件为反应时间60 min、反应温度75 ℃、pH 9、体积比1:2。对实验进行验证得硒含量为(2 985.89 $\pm$ 10.59) $\mu\text{g/g}$,该回归方程可应用于实践。

2.3 菌草灵芝多肽和菌草灵芝多肽-硒螯合物的红外光谱分析

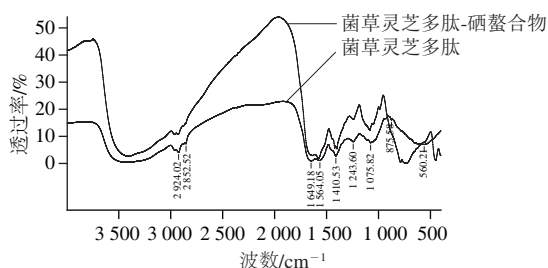


图6 菌草灵芝多肽和菌草灵芝多肽-硒螯合物的红外光谱图

Fig. 6 IR spectra of bioactive peptides from *Ganoderma lucidum* and their selenium chelate

由于菌草灵芝多肽链中含有氨基和羧基,所以红外光谱图中的吸收峰必然会随着氨基的伸缩振动、变角振动和羧基的伸缩振动等的变化而发生改变,当硒离子与多肽发生一系列的反应时,吸收峰的峰位也必然会随之发生变化。图6是菌草灵芝多肽和菌草灵芝多肽-硒螯合物的红外光谱图,可以明显看出,菌草灵芝多肽-硒螯合物的红外光谱曲线不同于菌草灵芝多肽。对菌草灵芝多肽的红外光谱图进行综合分析发现,在2 924 cm^{-1} 和2 852 cm^{-1} 处的吸收为C—H伸缩振动引起的特征吸收峰^[24]。而1 649 cm^{-1} 和1 564 cm^{-1} 处出现的吸收峰属于酰胺II带,是由N—H面内弯曲振动和C—N伸缩振动所引起的^[25]。1 410 cm^{-1} 属于菌草灵芝多肽氨基酸残基的羧基^[26-27],560 cm^{-1} 是由C=O的面外弯曲引起。与菌草灵芝多肽的红外光谱图相比,当多肽与硒离子发生反应后,整个波形发生了变化:菌草灵芝多肽-硒螯合物的红外光谱图在2 852 cm^{-1} 处的N—H伸缩振动峰消失了,推测应是诱导效应或者是偶极场效应导致其上面的电子云密度增大,力常数增大,频率升高^[28],而在低波数1 075 cm^{-1} 处吸收加强也证实了这一点,有可能是由于Se—N发生配位而引起伸缩振动;与菌草灵芝多肽相比,多肽-硒螯合物在875 cm^{-1} 处C—H的特征吸收峰发生了红移,是由C—H面外弯曲振动引起的,说明其参与了配位反应,并且在560 cm^{-1} 出现C=O的反对称振动吸收峰,推测应是硒离子与多肽上的羧基进行了螯合反应,这与Palika^[29]、Zhao Lina^[30]等的结论类似。通过对菌草灵芝多肽和菌草灵芝

多肽-硒螯合物的红外光谱对比可以看出,菌草灵芝多肽的氨基和羧基均参与了硒离子的配位,说明菌草灵芝多肽与硒螯合后生成了新的物质。

3 结论

利用响应面分析法优化菌草灵芝多肽与硒螯合的最佳工艺条件为反应时间60 min、反应温度75 ℃、pH 9、亚硒酸钠溶液与多肽溶液体积比1:2,在此条件下制备的螯合物中硒含量为(2 985.89 $\pm$ 10.59) $\mu\text{g/g}$,与响应面模型预测值3 075.29 $\mu\text{g/g}$ 无显著性差异,该模型可很好地应用于螯合工艺条件的优化。由红外光谱分析可知,菌草灵芝多肽和硒离子发生螯合反应,生成了一种新型物质,即菌草灵芝多肽-硒螯合物,为合成有机硒化合物提供了一种新的原料,同时也为菌草灵芝的开发利用提供了一个新的思路。

参考文献:

- [1] 陈若芸. 灵芝化学成分与质量控制方法的研究综述[J]. 食药用菌, 2015, 23(5): 270-275.
- [2] 李靖. 响应面优化灵芝多糖提取工艺研究[J]. 食品工业, 2013(7): 22-24.
- [3] NONAKA Y, SHIBATA H, NAKAI M, et al. Anti-tumor activities of the antlered form of *Ganoderma lucidum* in allogeneic and syngeneic tumor-bearing mice[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2014, 70(9): 2028-2034.
- [4] MA H T, HSIEH J F, CHEN S T. Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*[J]. Phytochemistry, 2015, 114: 109-113.
- [5] TRIHARTANTO, ALI M, SARGOWO, et al. Effect of antioxidant and anti inflammation on subchronic toxicity administration of *Ganoderma lucidum* target organ kidney in cardiovascular diseases[J]. Journal of Hypertension, 2015, 33: e37-e38. DOI:10.1097/01.hjh.0000469860.92553.b6.
- [6] KOHLMEIER M. Selenium[J]. Nutrient Metabolism, 2003(Suppl): 722-728. DOI:10.1016/B978-012417762-8.50103-4.
- [7] RAYMAN M P, LYONS T P, COLE D J A. The importance of selenium to human health[J]. Lancet, 2000, 356: 233-241.
- [8] VALDIGLESIAS V, PÁ SARO E, MÉNDEZ J, et al. *In vitro* evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review[J]. Archives of Toxicology, 2010, 84(5): 337-351.
- [9] 包怡红, 王芳, 王文琼. 大豆多肽硒螯合物的制备及抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 27-32. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201316006.
- [10] WANG C, WANG C, LI B, et al. Zn(II) chelating with peptides found in sesame protein hydrolysates: identification of the binding sites of complexes[J]. Food Chemistry, 2014, 165C(3): 594-602.
- [11] PALIKA R, MASHURABAD P C, NAIR M K, et al. Characterization of iron-binding phosphopeptide released by gastrointestinal digestion of egg white[J]. Food Research International, 2015, 67: 308-314.
- [12] ZHAO L N, HUANG S L, CAI X X, et al. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10(3): 46-53.
- [13] 王莲芳, 窦春霞, 张连富, 等. 有机物中微量元素硒的测定[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 115-117. DOI:10.3969/j.issn.1003-5788.2007.01.033.

- [14] 李仁伟, 任丽娥, 黄光荣. 虾副产物制备的钙肽结合物理化性质研究[J]. 食品工程, 2013(2): 43-45. DOI:10.3969/j.issn.1673-6044.2013.02.015.
- [15] 张晓霞, 刘盛取, 李国英. 碱法水解黑鱼鱼鳞及制备多肽螯合钙工艺的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(12): 130-134.
- [16] 毛学英, 李明, 李敏, 等. 不同因素对酪蛋白酶解产物螯合亚铁盐能力的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 145-148. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.05.025.
- [17] 刘闪, 刘良忠, 李小娜, 等. 白鲢鱼骨胶原多肽螯合钙的工艺优化[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 76-81. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201410014.
- [18] 马利华, 秦卫东, 陈学红, 等. 金针菇多糖-Fe(II)螯合物的制备及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 202-207.
- [19] 金文刚, 吴海涛, 朱蓓薇, 等. 响应面优化虾夷扇贝生殖腺多肽-Ca²⁺螯合物制备工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 11-16. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201316003.
- [20] 孙莉洁, 梁金钟. 响应面法优化大豆肽与钙离子螯合的研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(1): 22-27.
- [21] 张强, 王松华, 孙玉军, 等. 米糠蛋白酶解物锌螯合物的制备工艺研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 281-283.
- [22] 李靖. 响应面优化灵芝多糖提取工艺研究[J]. 食品工业, 2013(7): 22-24.
- [23] 张冬雪, 王晓玲, 刘高强. 灵芝菌丝液体深层发酵产 β -葡聚糖的培养基优化[J]. 菌物学报, 2016, 35(6): 750-759. DOI:10.13346/j.mycosystema.150082.
- [24] 高菲, 王维有, 鲁军, 等. 海洋鱼骨胶原肽钙螯合物的制备及红外光谱表征[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015, 45(1): 47-54.
- [25] 张妹, 过世东. 氨基酸多肽螯合钙的制备及其工艺优化[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(4): 422-425.
- [26] 黄薇, 邓尚贵, 唐艳, 等. 鳕鱼皮复合肽螯合钙的制备及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2012, 37(3): 143-146.
- [27] 杨燊, 邓尚贵, 秦小明. 低值鱼蛋白多肽-钙螯合物的制备和抗氧化、抗菌活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 202-206. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.01.040.
- [28] 林慧敏. 带鱼下脚料酶解小肽亚铁螯合物结构鉴定及其生物活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [29] PALIKA R, MASHURABAD P C, NAIR M K, et al. Characterization of iron-binding phosphopeptide released by gastrointestinal digestion of egg white[J]. Food Research International, 2015, 67: 308-314. DOI:10.1016/j.foodres.2014.11.049.
- [30] ZHAO L N, HUANG Q M, HUANG S L, et al. Novel peptide with a specific calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate and the possible chelating mode[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(42): 10274-10282.