

寻氏肌蛤蛋白水解液制备锌蛋白盐的研究

孔美兰¹, 陈碧云¹, 刘谋泉¹, 孔德虎², 洪桂娜¹, 陈雪虹¹, 祁冰霜¹, 邱克繁¹, 陈远新¹

(1. 韩山师范学院生物系, 广东潮州 521041; 2. 泰兴市一鸣生物制品有限公司, 江苏泰兴 225433)

摘要 [目的] 利用寻氏肌蛤蛋白水解液制备高生物利用率的锌蛋白盐。[方法] 以寻氏肌蛤为原料, 通过限制性酶水解制备蛋白水解液, 与锌进行螯合, 以螯合率为试验指标, 通过单因素和 $L_9(3^4)$ 正交优化试验, 研究了 pH、温度、时间、配位比、不同锌源对螯合率的影响。[结果] 试验表明, 寻氏肌蛤蛋白水解液制备锌蛋白盐的螯合试验最佳条件为: pH 5, 温度 90 °C, 时间 30 min, 配位比为 2:1, $ZnSO_4$ 为锌源; 此条件下, 锌的螯合率为 67.51%。[结论] 研究可为寻氏肌蛤的深加工利用以及锌蛋白盐的制备提供参考依据。

关键词 寻氏肌蛤; 水解蛋白; 锌蛋白盐

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)27-11145-03

Study on Peptided-zinc Chelate of Hydrolyzed Protein from *Musculus senhoussei*

KONG Mei-lan et al (Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041)

Abstract [Objective] To study on peptided-zinc chelate of hydrolyzed protein from *Musculus senhoussei*. [Method] *Musculus senhoussei* peptided-zinc was produced by hydrolyzed *Musculus senhoussei* protein chelating with zinc. Taking the experiment target by the chelated rate, the effects of five independent variables (pH, temperature, time, peptide/ Zn^{2+} ratio, different source of zinc) were studied through single element experiment and $L_9(3^4)$ orthogonal experiment. [Result] The optimum condition was obtained as follows: pH 5, 90 °C, 30 min, peptide/ Zn^{2+} ratio 2:1, $ZnSO_4$ as source of zinc. Then the chelation of zinc was 67.51%. [Conclusion] The study can provide reference basis for deeply processing of *Musculus senhoussei* and preparation of peptided-zinc.

Key words *Musculus senhoussei*; Hydrolyzed protein; Peptided-zinc

寻氏肌蛤 (*Musculus senhoussei*), 俗称薄壳, 蛋白质含量高, 达 10.48%, 比有“海洋牛奶”之称的牡蛎还高出近 1 倍; 组成氨基酸比例合理; 矿物质含量明显高于其他海洋贝类生物, 尤其具有抗癌作用的硒元素含量很高, 是一种优质动物蛋白资源^[1]。寻氏肌蛤在每年的 5、6 月份大量上市, 主要用于鲜食, 少量经粗加工成寻氏肌蛤米出售或者作为优质海鱼鱼苗期饲料^[2]。集中上市时, 由于鲜食量有限, 造成寻氏肌蛤大量积压, 价格一再走低, 导致养殖户增产不增收。目前对寻氏肌蛤的研究仅限于营养成分和蛋白水解方面, 缺乏对其深加工方面的研究。

锌是已知的人体 14 种必需微量元素之一, 由于其在人体内广泛的生理生化作用而被称为“生命元素”。人类锌绝对缺乏比较少见, 但边缘性锌缺乏常见。这些人群容易缺锌的主要原因在于他们由于生理需要对锌的需求量较大而日常膳食中的锌摄入不足以及生物利用率较低, 这就造成机体处于锌缺乏状态^[3]。因此, 研究出高生物利用率的锌蛋白盐具有很现实的意义。

锌与蛋白多肽螯合形成的肽锌螯合物, 能借助小肽的吸收特点和机制以螯合物整体的形式通过小肠被主动吸收, 从而促进锌的吸收, 并增强体内酶的活性, 提高蛋白质、脂肪和维生素的利用率, 增强抗病免疫力, 调节生理代谢, 具有较高的生物学效价。因此, 锌与蛋白多肽螯合物是一种补锌的功能性营养强化剂^[4-7]。笔者在前期研究的基础上, 以锌的螯合率为指标, 采用寻氏肌蛤蛋白水解液与无机锌离子进行螯合反应, 以制备高生物利用率的锌蛋白盐。

1 材料与方法

1.1 材料 原材料: 寻氏肌蛤蛋白水解液, 自制。主要试剂: 无水乙醇、EDTA、醋酸锌、 $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 $ZnCl_2$ 等试剂, 均为分析纯。主要仪器: HJ-4 多头磁力加热搅拌器, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司; pHS-25 型酸度计, 上海伟业仪器厂; FA2104S 分析天平, 上海天平仪器厂; RE52CS 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; BYK-FD-1A-50 真空冷冻干燥机, 北京恒奥德仪器仪表有限公司; SHZ-82B 水浴恒温振荡器, 金华市岸头仪都仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 复合氨基酸液的制备。 寻氏肌蛤购于潮州市枫春批发市场, 将其清洗干净, 进行蒸煮, 取肉, 加 2 倍的水, 调节 pH 6.5, 添加 2.0% 的中性蛋白酶, 采用额定功率为 300 W 超声波处理 10 min, 55 °C 条件下水解 5 h。水解完成后采用沸水浴 15 min 灭酶, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为复合氨基酸液。

1.2.2 锌蛋白盐的螯合工艺^[8]。寻氏肌蛤蛋白水解液 → 调节 pH → 加入无机锌盐 → 水浴加热 4 000 r/min, 离心 5 min → 取上清液减压浓缩 → 浓缩液加入 5 倍体积无水乙醇 → 4 000 r/min, 离心 5 min → 取沉淀, 冷冻干燥后得到锌蛋白盐。

1.2.3 锌的螯合率的测定方法。 锌含量的测定^[9]采用 EDTA 络合滴定, 螯合率计算^[10]公式如下:

$$\begin{aligned} \text{螯合率} &= \frac{\text{螯合态锌含量}}{\text{锌元素的总量}} \times 100\% \\ &= \frac{CV_1}{CV_0} \times 100\% = \frac{V_1}{V_0} \times 100\% \end{aligned}$$

式中, C 为标准 EDTA 溶液的浓度 (mol/L); V_1 为滴定螯合态锌元素所消耗的 EDTA 溶液体积 (ml); V_0 为滴定锌元素总量所消耗的 EDTA 溶液体积 (ml)。

基金项目 韩山师范学院青年基金项目 (LQ200807)。

作者简介 孔美兰 (1977 -), 女, 江苏泰兴人, 讲师, 硕士, 从事食品生物技术方面的研究, E-mail: kongmeilan2003@163.com。

收稿日期 2013-08-14

1.2.4 单因素对锌蛋白盐螯合率的影响。以不同锌盐、配位比、pH、时间、温度为单因素进行试验,以锌的螯合率为指标,研究单因素对锌蛋白盐螯合率的影响。

1.2.4.1 不同锌盐对螯合率的影响。在 pH 6.0,配位比为 2.5:1,70 °C,20 min 条件下,选用乙酸锌、氯化锌、硫酸锌为不同锌源,研究不同锌源对螯合率的影响。

1.2.4.2 配位比对螯合率的影响。在螯合条件为:pH 6.0、70 °C、20 min、硫酸锌为试验锌源,研究氨基酸态氮与锌离子之间的配位比(1.0:1、1.5:1、2.0:1、2.5:1、3.0:1)对锌螯合率的影响。

1.2.4.3 pH 对螯合率的影响。在螯合条件为:70 °C、20 min、配位比为 2.5:1、硫酸锌为试验锌源,研究 pH(3、4、5、6、7、8、9)对锌蛋白盐螯合率的影响。

1.2.4.4 时间对螯合率的影响。在螯合条件为:70 °C、pH 7.0、配位比为 2.5:1、硫酸锌为试验锌源,螯合时间选取 10 ~ 60 min,10 min 为一个时间间隔,研究时间对锌蛋白盐螯合率的影响。

1.2.4.5 温度对螯合率的影响。在螯合条件为:30 min、pH 7.0、配位比为 2.5:1、硫酸锌为试验锌源,使螯合温度为 40 ~ 100 °C,温度间隔为 10 °C,研究温度对锌蛋白盐螯合率的影响。

1.2.5 寻氏肌蛤蛋白水解液螯合锌蛋白盐的最优条件研究。通过单因素试验和数据分析,进一步考虑各因素的综合影响。试验以配位比、pH、温度为因素,根据单因素试验结果确定其水平范围,分别选取了 3 个水平,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,因素水平设计见表 1,以锌的螯合率为指标,确定螯合锌蛋白盐的最优条件。

表 1 正交试验因素水平设计

| 水平 | 因素 | | | 空白 (D) |
|----|-------|---------------------------------|-------------|-----------|
| | pH(A) | 配位比(α -氨基态 氮:锌离子)(B) | 温度(C) °C | |
| 1 | 5 | 2.0:1 | 70 | 1 |
| 2 | 6 | 2.5:1 | 80 | 2 |
| 3 | 7 | 3.0:1 | 90 | 3 |

1.2.6 锌蛋白盐的分离。该试验采用有机溶剂无水乙醇来分离提纯水溶性的锌蛋白盐, $V_{\text{无水乙醇}}:V_{\text{锌蛋白浓缩液}}=5:1$ 。这是由于锌蛋白盐在乙醇、丙醇、丙酮等有机溶剂中的溶解度极小,而游离金属离子、氨基酸和小肽均能溶于乙醇等有机溶剂中,利用这一特性,不仅可以制得高纯度的锌蛋白盐,而且有利于对螯合物的进一步研究,同时有机溶剂的回收利用可有效地降低成本^[11-12]。

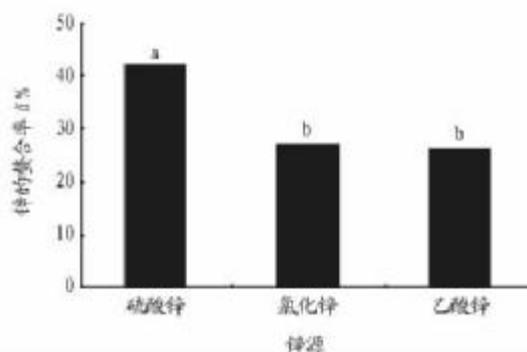
1.2.7 数据处理。原始数据的整理采用 Microsoft Excel (Office 2007) 软件完成,试验数据采用 SPSS16.0 软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 不同锌盐对螯合率的影响。由图 1 可知,以硫酸锌作为锌源螯合率最高,而乙酸锌和氯化锌的螯合率次之。通

过 SPSS 统计软件分析,氯化锌和乙酸锌的螯合率差异不显著,二者与硫酸锌的螯合率差异显著($P < 0.05$),因此直选择硫酸锌作为螯合用锌源。

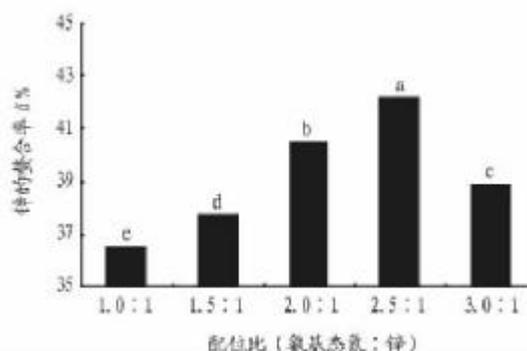


注:不同小写英文字母表示不同因素水平之间在 0.05 水平的差异显著性。

图 1 不同锌源对螯合率的影响

2.1.2 配位比对螯合率的影响。配位比即配位体与金属离子的摩尔比,该试验是指 α -氨基态氮与锌离子的摩尔比。它是影响金属离子与氨基酸、小肽络合反应的一个重要因素。如果配位体太小,不能形成稳定的环状结构,络合物不稳定;如果配位比太大,络合物虽然很稳定,但在经济上不可行,所以该试验试图找到一个能达到一定络合程度的最小配位比,既保证产品质量,又能充分利用氨基酸和小肽。

由图 2 可知,不同配位比对锌蛋白盐的螯合率影响差异显著。当原料配比小于 2.5:1 时,螯合反应进行不完全,螯合率偏低;当原料配比处于 2.5:1,锌螯合率已基本达到最大;当原料配比大于 2.5:1 时,螯合率有所下降,说明过分增加氨基酸和小肽的浓度不利于锌蛋白盐的形成。而且当配位比太大时生成的分子量过大,一方面稳定性过强难被生物体吸收利用;另一方面会造成氨基酸和小肽的浪费,经济上不划算。因此,选择 2.5:1 的原料配比为最佳试验条件合成锌蛋白盐。

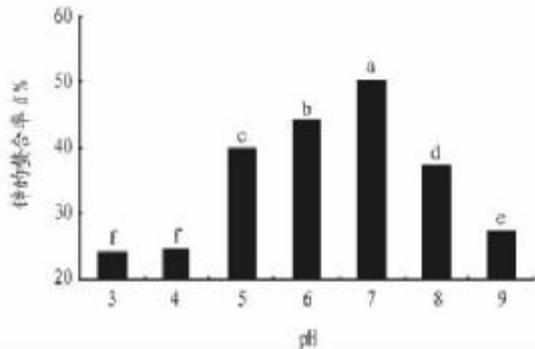


注:不同小写英文字母表示不同因素水平之间在 0.05 水平的差异显著性。

图 2 配位比对螯合率的影响

2.1.3 pH 对螯合率的影响。由图 3 可知,不同 pH 对锌蛋白盐的螯合率影响差异显著。随着 pH 的增大,锌的螯合率逐渐增大,当 pH 达到 7.0 以后,螯合率急剧下降。主要因为在 pH 较低的酸性条件下, H^+ 将与金属离子竞相争夺金属离

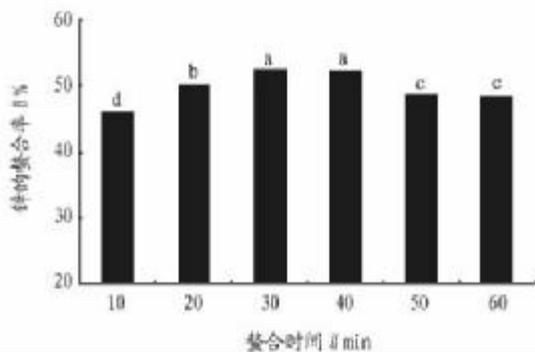
子形成氧化物沉淀;在 pH 较高的碱性条件下,羟基争夺了锌离子而优先生成氢氧化锌沉淀^[13]。因此,选取 pH 7.0 为单因素最佳 pH。



注:不同小写英文字母表示不同因素水平之间在 0.05 水平的差异显著性。

图 3 pH 对螯合率的影响

2.1.4 螯合时间对螯合率的影响。由图 4 可知,螯合时间对锌蛋白盐的螯合率的影响总体差异不显著。螯合反应在 30 min 时就达到最大值。之后随着时间的延长,螯合率呈慢速下降趋势。这是由于螯合反应是快速反应,但是在 70 °C 这样的温度下,新形成的螯合物也会部分分解还原为复合氨基酸、小肽和锌无机盐。因此,螯合时间确定为 30 min。



注:不同小写英文字母表示不同因素水平之间在 0.05 水平的差异显著性。

图 4 螯合时间对螯合率的影响

2.1.5 温度对螯合率的影响。由图 5 可知,螯合时间对锌蛋白盐的螯合率的影响总体差异显著。随着螯合温度的升高,螯合率呈上升的趋势,当温度超过 80 °C 时,螯合率开始下降。这是由于螯合反应为吸热反应,因而反应温度越高对反应越有利,但若反应温度过高,则易破坏肽及螯合物的结构;若反应温度太低,则螯合反应速度较慢且收率较低,所以选择反应温度为 80 °C,此时锌螯合率最高。

2.2 锌蛋白盐螯合条件的优化 由表 2 可知,螯合影响因素由主到次依次是 A、B、C;螯合的最优方案是 A₁B₁C₃,即最佳螯合条件是:pH 5,配位比为 2.0:1,温度 90 °C。同时由表 3 可知,pH 对锌蛋白盐螯合率的影响差异极显著 ($P < 0.01$)。根据试验要求对最优方案进行验证性试验,重复 3 次,所测得的锌蛋白盐螯合率的平均值为 67.51%,高于正交试验表 2 中最高螯合率(64.10%)。

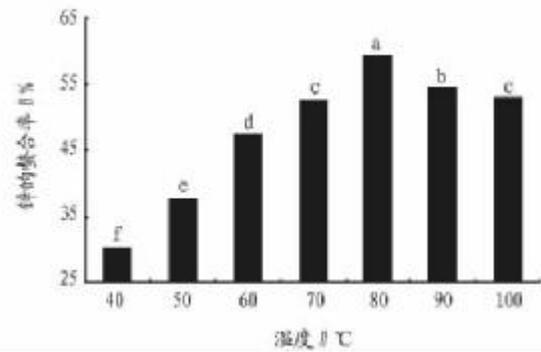


图 5 温度对螯合率的影响

表 2 正交实验结果

| 试验号 | 因素 | | | | 螯合率 % |
|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | A | B | C | D | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 62.58 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 55.43 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 64.10 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 55.61 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 53.27 |
| 5 | 2 | 3 | 1 | 2 | 53.35 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 48.92 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 46.00 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 44.26 |
| K_1 | 182.11 | 167.11 | 161.93 | 160.11 | |
| K_2 | 162.23 | 154.70 | 155.30 | 157.70 | |
| K_3 | 139.18 | 161.71 | 166.29 | 165.71 | |
| R | 14.31 | 4.13 | 3.66 | 2.97 | |

表 3 正交试验方差分析

| 来源 | F 值 | 显著性 |
|----|---------|-------|
| 模式 | 668.202 | 0.001 |
| A | 27.332 | 1.813 |
| B | 2.293 | 0.035 |
| C | 0.304 | 0.355 |

注: $R^2 = 1.000$ (调整 $R^2 = 0.998$)。

2.3 锌蛋白盐的性质 采用乙醇沉淀法分离出来的锌蛋白盐是一种白色粉末状固体,无异味,易溶于水,不溶于乙醇等有机溶剂,室温下稳定存在。

3 结论

利用寻氏肌蛤蛋白水解液与无机锌离子螯合成锌蛋白盐。试验采用单因素和正交试验,考察了螯合 pH、温度、时间、锌源、配比对锌的螯合率的影响,最终确定了最佳螯合条件是:pH 5,配位比为 2.0:1,温度 90 °C,时间 30 min,硫酸锌作为锌源,在此条件下螯合率为 67.51%。采用硫化钠法初步证实了小肽与锌离子的螯合结构。

参考文献

- [1] 余纲哲,傅明辉. 寻氏肌蛤营养成分分析[J]. 海洋科学,1996(5):9-11.
- [2] 蔡英亚. 寻氏肌蛤的养殖和利用[J]. 水产与教育,1975(1):9-11.
- [3] 杨月欣,刘建宇,崔红梅. 四种锌化合物的生物利用率的比较[J]. 营养学报,1998,20(2):157-162.
- [4] 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.

(下转第 11149 页)

的最佳水平,最佳提取工艺为 $A_2B_3C_2D_3$,可根据缩短工时原则取 D_2 ,最终的较优方案为 $A_2B_3C_2D_2$,即 40 倍量水,90 °C 提取 3 h,共提取 2 次。进行验证性试验,多糖提取率为 16.81%,说明了正交试验优化结果是可靠的。

表 2 正交试验结果

| 试验号 | 因素 | | | | 粗多糖质量//g | 粗多糖得率//% | 多糖含量//% | 多糖提取率//% |
|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|---------|----------|
| | A | B | C | D | | | | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.6 | 6 | 44.55 | 2.67 |
| 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1.4 | 14 | 64.34 | 9.01 |
| 3 | 3 | 1 | 3 | 3 | 1.5 | 15 | 47.24 | 7.56 |
| 4 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2.0 | 20 | 82.19 | 16.44 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1.7 | 17 | 78.05 | 13.27 |
| 6 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1.9 | 19 | 77.33 | 14.69 |
| 7 | 1 | 3 | 3 | 2 | 2.4 | 24 | 69.30 | 16.63 |
| 8 | 2 | 3 | 1 | 3 | 2.0 | 20 | 82.80 | 16.56 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 2.3 | 23 | 66.67 | 15.33 |
| K_1 | 35.74 | 19.24 | 33.92 | 31.27 | | | | |
| K_2 | 38.84 | 44.40 | 40.78 | 40.33 | | | | |
| K_3 | 37.58 | 48.52 | 38.81 | 40.56 | | | | |
| R | 3.10 | 29.28 | 6.86 | 9.29 | | | | |

表 3 方差分析

| 方差来源 | F | P |
|------|---------|------------|
| A | 5.228 | - |
| B | 154.007 | $P < 0.05$ |
| C | 20.889 | - |
| D | 50.736 | - |

2.2 精密度试验 精密称定同一样品,重复测定吸光度 5 次,测定结果 RSD 为 1.243%,表明该仪器精密度良好。

2.3 重复性试验 对同一批样品重复取样 5 次,按样品测定方法操作,测定结果 RSD 为 3.684%,表明该方法重复性良好。

2.4 稳定性试验 取同一样品,按样品测定方法操作,每隔 0.5 h 测定 1 次吸光度,连续测定 5 次,结果 RSD 为 3.513%,表明供试品溶液在 2.5 h 内稳定。

3 讨论

多糖是一种重要的生物活性物质,有降血脂、抗氧化、清

除自由基、抗辐射、抗凝血、抗血栓、抗溃疡、抗突变、抗病毒等作用,其独特活性及低毒效应在临床应用中具有极大的潜力^[4]。

该试验表明,银耳中多糖含量较高,确实为其发挥功效的物质基础成分。该试验优选了银耳多糖的最佳提取工艺:40 倍量蒸馏水,90 °C 提取 3 h,共提取 2 次,此条件下多糖的得率最高,可为银耳多糖的开发应用提供依据。

参考文献

- [1] 陈岗. 银耳多糖的功能特性及其应用[J]. 中国食品添加剂,2011(4):144-148.
- [2] 郑良. 银耳多糖提取条件及提取液黏度特性的研究[D]. 成都:四川大学,2003.
- [3] 王峥,李云森,李绍顺. 苯酚-硫酸法测定百蕊草中多糖的含量[J]. 中国现代应用药学,2006,23(6):483-484.
- [4] 陈飞飞,蔡东联. 银耳多糖的主要生物学效用研究进展[J]. 中西医结合学报,2008,6(8):862-866.
- [5] 刘卉,何蕾. 银耳多糖与透明质酸的保湿性能比较[J]. 安徽农业科学,2012,40(26):13093-13094.
- [6] 曹银娣,陈巧云,熊华,等. 米蛋白肽铁的螯合条件优化[J]. 食品与发酵工业,2007,33(4):61-64.
- [7] 刘永,黎彬庆,韦寿莲. 罗非鱼鳞胶原蛋白肽锌螯合物制备工艺优化[J]. 食品与发酵工业,2013,39(4):125-128.
- [8] 孙克岩,张志胜,佟海菊,等. 响应面优化牡蛎复合氨基酸螯合锌制备工艺研究[J]. 食品科技,2011,36(7):107-109.
- [9] 吴春,黄梅桂. 响应曲面法优化槲皮素络合反应条件的研究[J]. 化学世界,2008(10):37-40.
- [10] 曾仁权,钟国情. 复合氨基酸微量元素螯合物制备新工艺的研究[J]. 化学研究与应用,1998(10):99-102.
- [11] 吴茹怡,曾里,曾凡骏. 复合氨基酸螯合物鉴定方法的研究[J]. 食品科技,2006(3):104-107.
- [12] 张红漫,陈国松,冯改霞,等. 单项氨基酸微量元素螯合物的研究[J]. 氨基酸和生物资源,2002,24(4):46-50.
- [13] BASOLO F, JOHNSON R C. Coordination Chemistry The Chemistry of Metal Complexes [M]. California: W. A. Benja min. Inc. Publisher, 1964: 233-237.
- [14] STRICKLAND R D, FREEMAN M L, GURULE F T. Copper binding proteins in alkaline solution [J]. Analytical Chemistry, 1961, 33(4): 545-552.

(上接第 11147 页)